

THÈSE

présentée

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lyon

pour obtenir

le diplôme de Docteur du 3^e Cycle en Biologie Végétale

par

André MOIROUD

INFLUENCE DE LA TENSION D'OXYGÈNE SUR LA RESPIRATION DE QUELQUES LEVURES

Soutenue le 25 Septembre 1965
devant la Commission d'examen

MM. KUHNER Président

DUCET }
BOIDIN } Examinateurs

INFLUENCE DE LA TENSION D'OXYGENE
SUR LA RESPIRATION
DE QUELQUES LEVURES

par MOIROUD André

LABORATOIRE DE BOTANIQUE
FACULTE DES SCIENCES
LYON



UNIVERSITE DE LYON
FACULTE DES SCIENCES

Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honoraires

MM. LOCQUIN, de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD,
EYRAUD Henri, DEJARDIN, VIRET.

Doyen

M. BRACONNIER

Assesseurs

MM. MESNARD

BOIDIN

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
PRETTRE	Chimie industrielle
COURTY	Chimie-Physique
KUHNER	Botanique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie Minérale
AUMERAS	Chimie générale II
COLONGE	Chimie organique
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD	Physique industrielle
DUFAY Jean	Astronomie
NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER Henri	Géologie générale
WAUTIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie biologique
CUEILLERON	Chimie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
EYRAUD Charles	Chimie-Physique appliquée
SARAZIN	Physique nucléaire

MM.	BOIDIN	Microbiologie et Mycologie
	PERES	Physiologie
	MESNARD	Electronique
	GRANDMONTAGNE	Physique
	BOUTILLIER	Minéralogie
	LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
	DREUX	Chimie organique
	TEICHNER	Chimie industrielle
	PAVANS de CECCATTY	Zoologie
	MERLIN	Chimie analytique
	DUFAY Maurice	Physique de l'atmosphère
	PHILBERT	Physique nucléaire
	COHEN-ADAD	Chimie
	DAVID Louis	Géologie générale
	CHANEL	Psychophysiologie
	MAURY	Méthodes Mathématiques de la
		Physique
	DEPRAZ	Physique nucléaire
	GAUTHIER Jean	Chimie
	GAUME	Physique expérimentale

Professeurs sans chaire

MM.	FERON	Mathématiques
	LAFORGUE	Physique
	LEGAY	Zoologie expérimentale S.P.C.N.
	UZAN	Physique S.P.C.N.
	CHENEVOY	Géologie appliquée
	GINET	Zoologie
	ASCH	Physique
	MICHEL Pierre	Minéralogie
	DUCET	Biologie végétale
Mle.	MAITROT	Physique
	GEVIN	Géologie générale
	PONASSE	Mathématiques
	d'INCAN	Physique
	LEFEBVRE	Mathématiques
	PERNET	Mathématiques
	CHERY	Physique
	BERGEON	Physique C.S.U.
Mle.	GAUTHERON	Chimie biologique
	DESCOTES	Chimie organique
	ERBEIA	Physique
Mme.	ERICSON	Physique générale
	LEMOIGNE	Botanique

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Maîtres de Conférences

MM.	MARTEL	Mécanique
	MATHIEU	Mécanique des Fluides
	PICARD Philippe	Mathématiques
	DEMARCO	Géologie générale
	MICHEL Georges	Biochimie
	LEBRETON	Biologie végétale
	DAVID Jean	Biologie animale
	TOUSSET	Chimie propédeutique
	FEUVRAIS	Physique Electricité
	PICARD Claude	Mathématiques
	SCHMITT	Physique M.P.C.
	LAURENT	Chimie organique
	ROT	Mathématiques
	BETHOUX	Mathématiques T.M.P.
Mle.	CALAIS	Mathématiques C.S.U.
	GUSAKOW	Physique
Mle.	THOMAS	Chimie Minérale

Maître de Conférences adjoint

M.	PIERRON	Chimie
----	---------	--------

Conseiller Administratif

M.	BURNET
----	--------

Secrétaire Principal Honoraire

M.	ROUX
----	------

P R E F A C E

Avant de commencer l'exposé de ce mémoire, nous nous faisons un très agréable devoir d'exprimer notre reconnaissance respectueuse à Messieurs les Professeurs R. KÜHNER et J. BOIDIN, qui ont bien voulu nous accueillir dans leurs laboratoires comme Assistant.

Toute notre gratitude va à Monsieur le Professeur G. DUCET qui, après nous avoir proposé un sujet, nous a constamment prodigué ses précieux conseils, a porté un vif intérêt à nos recherches et a su éveiller en nous le goût de la recherche. Au cours de la rédaction de ce manuscrit nous avons trouvé en lui un critique rigoureux et bienveillant.

Que Monsieur le Professeur R. KÜHNER trouve ici l'expression de notre reconnaissance, pour nous avoir fait l'honneur de présider notre jury de thèse, ainsi que Monsieur le Professeur J. BOIDIN qui a bien voulu juger notre travail et participer à notre jury.

Nous remercions vivement Mademoiselle M.C. PIGNAL, attachée de Recherche au C.N.R.S., qui nous a fourni les souches de levures étudiées.

Enfin que tous les membres du laboratoire de Botanique veuillent bien trouver ici l'expression de notre sincère et profonde gratitude.

- S O M M A I R E -

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - METHODES DE MESURE DE LA RESPIRATION	
A - LES MACROMETHODES	
1) METHODES CHIMIQUES	3
2) METHODES PHYSIQUES	4
B - LES MICROMETHODES	
1) METHODES MANOMETRIQUES	5
2) METHODES VOLUMETRIQUES	10
C - METHODE AMPEROMETRIQUE	
1) METHODE POLAROGRAPHIQUE	11
CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES	
A - METHODES	19
B - MATERIEL	25
C - CRITIQUES DES METHODES	28
CHAPITRE III - RESULTATS EXPERIMENTAUX	
1) Debaryomyces bisporus	32
2) Debaryomyces globosus	35
3) Debaryomyces hansenii	38

CHAPITRE IV -

DISCUSSION

1) Influence d'une aération prolongée sur la respiration des levures placées dans un milieu non glucosé	41
2) Relation possible entre vitesse maximale de respiration et concentration en cellules	43
3) Action du glucose sur la respiration	43
4) Effet de l'agitation du milieu pendant l'incubation	46
5) Influence de la tension d'oxygène	49
 CONCLUSION GENERALE	 61
 BIBLIOGRAPHIE	 63

I N T R O D U C T I O N

Dès la fin du 18^e siècle divers auteurs ont montré que les végétaux - en absence totale de mouvements respiratoires - consomment de l'oxygène et rejettent du gaz carbonique.

Puis très rapidement, on se rendit compte que ces échanges gazeux ne constituent qu'un aspect superficiel de la respiration; ce qui importe, ce ne sont pas ces échanges spectaculaires, mais les modifications intimes, intracellulaires.

Dès lors, au fur et à mesure du progrès des connaissances dans les domaines biochimique et physiologique, le terme "respiration" a vu sa signification évoluer. Pour certains auteurs, la respiration cellulaire peut se définir comme l'oxydation de composés organiques par l'oxygène moléculaire. Pour d'autres, le problème est essentiellement celui du transfert d'électrons et de protons H^+ à partir de substances organiques - grâce à une série de catalyseurs - jusqu'à l'oxygène moléculaire avec formation d'eau, oxydation qui s'accompagne souvent du rejet de gaz carbonique.

Mais une telle définition de la respiration est encore restrictive. En effet, l'oxydation de composés comme le méthane, l'ammoniac, les nitrites, l'oxyde de carbone, ne diffère sans doute pas fondamentalement de celle du glucose ou de l'alcool éthylique. Pourtant, ce type de respiration est souvent considéré comme distinct.

Certains physiologistes considèrent comme une forme de respiration la dégradation anaérobie des hydrates de carbone en éthanol et gaz carbonique, ou en acide lactique. Mais dans une telle dégradation anaérobie des sucres, l'accepteur d'électrons est un composé organique. Aussi préfère-t-on désigner ce métabolisme sous le terme de "fermentation". Toutefois, nombre de réactions de la fermentation peuvent se rencontrer au cours de la respiration et, d'autre part, le

métabolisme fermentatif peut, chez certains organismes, se rencontrer dans des conditions aérobies. On reconnaît ainsi des fermentations à la fois aérobies et anaérobies. Dans ces conditions, c'est la réduction de l'oxygène en eau qui est déterminante et non pas la présence ou l'absence de ce gaz.

Depuis longtemps déjà, on sait que les phénomènes respiratoires s'accompagnent de la libération de l'énergie potentielle des aliments, sous une forme utilisable par la cellule. Aussi un certain nombre de biochimistes ont proposé d'utiliser comme critère de respiration non plus l'intervention de l'oxygène mais la libération d'énergie.

La respiration peut alors être définie comme l'ensemble des phénomènes de désassimilation dont les caractéristiques sont la dégradation de substances complexes en composés plus simples, l'accepteur d'électrons étant finalement l'oxygène et la libération d'une énergie utilisable pour les synthèses.

Grâce aux échanges gazeux entre l'organisme et le milieu extérieur, la respiration est un phénomène qui paraît aisément accessible. Ces échanges sont suffisamment importants pour permettre des études quantitatives et qualitatives, au moyen de méthodes éprouvées et précises.

Aussi, après avoir tenté de définir la respiration, est-il bon de faire une revue rapide des différentes méthodes utilisées pour la mesure des échanges gazeux respiratoires.

C H A P I T R E I

METHODES DE MESURE DE LA RESPIRATION

L'idéal, lors des mesures quantitatives de la respiration, serait de pouvoir doser les produits initiaux et finaux : l'oxygène consommé, le gaz carbonique et l'eau formés, l'énergie libérée. Mais cet idéal est inaccessible et l'on se contente généralement de chercher à évaluer l'absorption d'oxygène et la production de gaz carbonique.

Parmi les nombreuses méthodes de mesure de la respiration, on peut distinguer :

A - LES MACROMETHODES

1) - METHODES CHIMIQUES.

Nous n'en citerons que quelques unes, souvent utilisées.

a) eudiomètre de PLANTEFOL (45).

Cet appareil est un analyseur de gaz très précis, dans lequel les gaz présents sont absorbés successivement, par des réactifs convenables. Après chaque absorption le volume restant est soigneusement mesuré par comparaison avec un volume de gaz non traité. On détermine ainsi, à partir d'échantillons gazeux prélevés après des temps variables dans l'enceinte close où sont placés les objets en expérience, la quantité d'oxygène absorbé et de gaz carbonique rejeté.

b) méthode du circuit fermé.

A l'entrée de la chambre respiratoire, un ballon jaugé contenant de l'air apporte automatiquement la quantité

de gaz nécessaire à la respiration de l'être vivant. L'air chargé de gaz carbonique passe ensuite dans un récipient contenant de la potasse. On extrait alors ce gaz à l'aide d'un acide, pour en déterminer le volume.

Un dispositif approprié renvoie l'air dans la chambre respiratoire.

c) méthode du circuit ouvert.

Un courant d'air, établi à l'aide d'une trompe à eau, traverse la chambre respiratoire. Avant son entrée, l'air est débarrassé de son gaz carbonique en passant dans une solution de potasse. A sa sortie, il passe de nouveau dans un flacon de potasse qui retient le gaz carbonique rejeté par l'organisme. Le volume de CO_2 est déterminé par titration. La consommation d'oxygène s'évalue à partir de la variation de poids du végétal. Le poids d'oxygène absorbé est égal à la différence entre la somme de CO_2 et H_2O perdus et la diminution de poids du "substrat".

2) - METHODES PHYSIQUES.

a) mesure de l'oxygène (YOUNG, BIALE) (59).

Elle est basée sur le paramagnétisme de l'oxygène. Ce gaz, placé dans un champ magnétique, tend à s'orienter pour recevoir un flux maximum. Cette propriété est utilisée dans divers dispositifs dont le plus répandu est celui de l'analyseur Beckmann.

b) mesure du gaz carbonique (LEBLOND) (33)

Ce gaz peut absorber une partie du rayonnement infrarouge et présente un spectre caractéristique. Divers dispositifs ont été imaginés qui transforment les variations de cette absorption en variations électriques. En France, l'O.N.E.R.A. a breveté un dispositif qui permet de doser avec précision des quantités très petites de gaz carbonique dans un mélange gazeux.

B - LES MICROMETHODES

Deux grands types de méthodes ont été employées pour l'étude des échanges gazeux portant sur de faibles volumes.

Certaines reposent sur les mêmes principes que les macrométhodes et réalisent seulement un perfectionnement dans le sens de la micromesure.

D'autres, au contraire, s'appuient sur des principes jusqu'ici non appliqués à l'étude des échanges gazeux.

Ces méthodes sont basées sur deux applications différentes de la loi de Mariotte :

1 - pour maintenir constant le volume gazeux à l'intérieur de la chambre de réaction, il faut faire varier la pression d'une valeur égale à celle engendrée par la variation de volume gazeux.

2 - pour maintenir la pression constante à l'intérieur de la chambre de respiration, il faut modifier le volume gazeux d'une quantité correspondant au volume de gaz absorbé par l'organisme.

Les méthodes qui s'appuient sur le premier principe constituent les méthodes manométriques alors que celles qui reposent sur le deuxième principe constituent les méthodes volumétriques.

Dans tous les cas, des dispositifs appropriés permettent de garder constants ou d'éliminer, selon les besoins, les facteurs externes, susceptibles d'amener des variations indésirables dans les échanges gazeux.

1) - METHODES MANOMETRIQUES

Ces méthodes se divisent en deux groupes. Dans les unes, qualifiées de méthodes manométriques directes, la variation de la pression gazeuse à l'intérieur de la chambre de respiration se traduit directement par un mouvement du fluide dans le manomètre; dans les autres, la variation du volume gazeux provoque un changement de la densité d'un petit objet flottant au sein d'un milieu liquide bien défini : ce sont les méthodes manométriques gravimétriques.

a) méthodes manométriques directes.

i) respiromètre de WARBURG (57)

Le respiromètre de WARBURG est constitué d'un tube en U de faible diamètre dont l'une des branches présente une dérivation latérale en communication, par un rodage, avec la chambre d'expérience, alors que l'autre est en communication directe avec l'atmosphère. Les branches verticales du tube sont graduées en millimètres et sa partie inférieure communique avec un réservoir de caoutchouc fermé par un dispositif à vis. Un liquide de densité connue remplit le réservoir et une partie de chaque branche. Chaque variation de volume gazeux dans la chambre d'expérience se traduit par une variation du niveau du liquide dans le manomètre. Grâce au dispositif à vis, il est possible d'ajuster le liquide, dans la branche en communication avec la chambre d'expérience, à un niveau tel que le volume gazeux reste constant. On transforme alors les variations de volume en variations de pression que l'on mesure sur la branche libre.

Calcul de la constante.

La convention habituelle est de considérer toutes les quantités de gaz rejeté par une réaction comme positives et toutes les quantités absorbées comme négatives. Les lectures seront alors considérées comme positives ou négatives selon qu'elles traduisent un rejet ou une absorption de gaz. Dans le manomètre la lecture sera positive si le liquide monte dans la branche libre.

Soit x = quantité de gaz produit ou absorbé pendant un temps t , à température₃ et pression normales, exprimée en mm.
 h = différence des niveaux du liquide manométrique dans la branche libre pendant le temps t , exprimée en mm.
 v_g = volume de l'espace gazeux dans la chambre d'expérience.
 v_f = volume de liquide dans la chambre d'expérience.
 T = Température absolue du bain-marie.
 P = pression initiale dans le flacon (en général égale à la pression barométrique).

P_o = pression normale (760 mm Hg) en mm de fluide manométrique.

(si D est la densité du fluide,

$$P_o = 760 \times \frac{13.60}{D}$$

p = pression de vapeur d'eau à la température T.

α = solubilité du gaz produit ou absorbé, dans le liquide du flacon (en mm³ de gaz, pour les conditions normales, dans 1 cm³ de liquide à l'équilibre avec une pression partielle de gaz égale à P_o),

on montre alors que :

$$x = h \left[\frac{v_g \frac{273}{T} + v_f}{P_o} \right]$$

L'expression entre [] demeure constante pour un gaz donné, avec un appareil donné, à condition que le volume de liquide et la température demeurent constants.

Cette quantité est connue comme la constante (k) de l'appareil. Si on connaît sa valeur, il suffit de multiplier h par celle-ci, et on obtient immédiatement la quantité de gaz dégagé ou absorbé en mm³ de gaz sec, pour des conditions normales de température et de pression.

Comme les conditions de température et de pression atmosphérique peuvent varier pendant une expérience, la variation h' d'un thermobaromètre, constitué par un dispositif semblable mais dans lequel la chambre d'expérience contient seulement de l'eau, permet de corriger la variation h du dispositif expérimental.

ii) respiromètre différentiel de BARCROFT (2)

Dans le respiromètre de WARBURG, une des extrémités du manomètre est réunie au flacon contenant l'organisme en expérience, alors que l'autre est en relation directe avec l'atmosphère.

Dans l'appareil de BARCROFT, la branche libre du manomètre est réunie à un deuxième flacon qui joue le rôle de compensateur. Ainsi les lectures ne sont pratiquement plus affectées par les variations de température ou de pression qui peuvent se manifester pendant le déroulement de l'expérience. D'autre part, le manomètre est un simple tube en U, sans système d'ajustement. De ce fait la valeur de la pression est obtenue à partir de la différence des hauteurs de liquide dans chacune des branches du manomètre. Enfin, une troisième différence réside dans l'emploi d'un manomètre oblique : la pression p est alors liée à la longueur l de la colonne manométrique par la relation $p = l \cos.\theta$, θ représentant l'angle du manomètre par rapport à la verticale.

La théorie de l'appareil et le calcul de la constante permettant de connaître le volume gazeux absorbé, sont plus complexes que dans celui de WARBURG. Le volume et la pression varient en effet dans l'un et l'autre des deux flacons. Cet appareil ne fonctionne donc pas réellement à volume constant puisque le volume de la chambre d'expérience est variable. Mais le volume gazeux total (des deux flacons plus le capillaire) est constant. Ceci permet d'appliquer une correction qui le rend assimilable à un système à volume constant.

Si x est le volume gazeux absorbé ou dégagé, on pourra le calculer en multipliant la longueur l par une constante donnée par la formule :

$$k = \left(\cos \theta + \frac{\frac{A}{2} \frac{273}{T} (P' - p + \Delta P')}{v'_g \frac{273}{T} + v'_f \alpha} \right) \times \left(\frac{v_g \frac{273}{T} + v_f \alpha}{P_0} + \frac{\frac{A}{2} \frac{273}{T}}{P_0} \frac{(P-p) \frac{h}{\Delta P} + h}{P_0} \right)$$

dans laquelle :

- v_g = μ l de gaz dans le flacon de réaction.
- v'_g = μ l de gaz dans le flacon de compensation
- v_f = μ l de liquide dans le flacon de réaction (comprenant le tissu).
- v'_f = μ l de liquide dans le flacon de compensation.
- A = aire de la section du capillaire manométrique en mm^2 .
- h = lecture manométrique en mm (différence de hauteur du liquide manométrique dans les branches du manomètre).
- P_o = pression normale (760 mm Hg), en mm de liquide manométrique.
- P = pression atmosphérique (corrigée), en mm de liquide manométrique.
- ΔP = augmentation de la pression du gaz confiné dans le flacon de réaction.
- $\Delta P'$ = augmentation de la pression du gaz confiné dans le flacon de compensation.
- p = pression de vapeur d'eau dans les volumes gazeux, en mm de liquide manométrique.
- T_o = température absolue.
- T = température du gaz et du liquide dans les flacons en degrés absolus.
- α = coefficient de solubilité du gaz produit ou absorbé (μ l par μ l de liquide).

Cette constante comprend quatre facteurs :

- le premier, $\cos \theta$ est lié à l'inclinaison de l'appareil.
- le deuxième exprime l'effet de la bouteille de compensation.
- le troisième est la correction de température et de pression.
- le quatrième traduit le changement de volume dû au déplacement du liquide manométrique.

iii) respiromètre de STEFFANELLI (52)

C'est un système à pression constante qui a une sensibilité de l'ordre de $0,003 \text{ mm}^3$ et qui a permis à STEFFANELLI de mesurer la respiration d'un oenof isolé de batracien. L'auteur propose deux types d'appareils; un manomètre simple rappelant un micro-WARBURG, et un microrespiromètre différentiel qui se rapproche d'un micro-BARCROFT.

b) méthode manométrique densimétrique

le ludion

Le ludion de DESCARTES adapté à la mesure d'échanges gazeux permet d'atteindre une bonne précision et une sensibilité remarquable. L'adaptation du ludion à la mesure d'échanges gazeux très faibles a été réalisée par LINDERSTRØM-LANG en 1937 (37). Depuis, divers perfectionnements ont été apportés, améliorant la sensibilité de l'appareil FOURCHE (19).

Principe :

"à tout changement du volume à l'intérieur du ludion correspond un changement déterminé de la pression nécessaire pour maintenir le ludion en équilibre à un niveau fixe".

2) - METHODES VOLUMETRIQUES

a) respiromètre de FENN (18).

L'appareil consiste essentiellement en deux flacons reliés par un capillaire horizontal contenant une goutte d'huile servant d'index. Un flacon contient l'organisme, le milieu physiologique et les substances réactionnelles, l'autre le milieu et les réactifs seulement. Les changements de volume gazeux dûs à la respiration de l'organisme se traduisent uniquement par un déplacement de l'index puisque le capillaire est horizontal.

b) respiromètre de CHEN (9).

Il comprend un capillaire horizontal parfaitement cylindrique ajusté à une petite chambre hermétiquement close par de la vaseline. On suit les déplacements dans le capillaire d'un ménisque constitué, à l'intérieur, d'une goutte de NaOH et, à l'extérieur, d'une goutte d'huile de paraffine, limitant la diffusion.

c) respiromètre de CUNNIGHAM-KIRK (11).

L'appareil consiste en un tube capillaire dont une extrémité est renflée en une chambre de réaction tandis que l'autre est ouverte à l'air. Un index liquide indique les variations du volume gazeux. La température doit être rigoureusement constante, car la moindre variation provoque un déplacement de l'index de l'appareil fonctionnant comme thermomètre sensible.

CUNNIGHAM et KIRK ont utilisé cet appareil pour l'étude de la respiration des Paramécies.

d) burette micrométrique de SCHOLANDER (50).

La pression est maintenue constante à l'intérieur du récipient de réaction en restituant à l'aide d'une micro-burette le volume d'oxygène utilisé par l'organisme.

La sensibilité de ce respiromètre est de $0,3 \text{ mm}^3$ à l'heure. Un autre type de burette de SCHOLANDER possède une sensibilité de $0,01 \text{ } \mu\text{l}$ à l'heure. L'appareil, basé sur le même principe, est de dimensions plus réduites.

C - METHODE AMPEROMETRIQUE

1) - METHODE POLAROGRAPHIQUE.

C'est en 1924 que HEYROVSKY (26) (27) posa les principes de la polarographie, méthode de mesure basée sur les phénomènes d'électrolyse et utilisant une électrode à gouttes de mercure.

Lorsque l'on établit une différence de potentiel entre deux électrodes plongeant dans une cuve à électrolyse, tous les ions présents dans la solution jouent un rôle dans le transport du courant, rôle dont l'importance varie avec leur concentration et leur mobilité. Si on applique une force électromotrice variable, on peut noter pour chaque valeur de celle-ci, l'intensité du courant correspondant. En portant en abscisses le potentiel et en ordonnées l'intensité, on obtient une série de points qui permettent de tracer une courbe "intensité-voltage" (pl. I fig. I).

L'examen de cette courbe permet de faire les observations suivantes :

- en-dessous du potentiel de décomposition, le courant est très faible; on le désigne sous le nom de courant résiduel. En effet, chaque ion est caractérisé par un potentiel de décharge en-dessous duquel il ne peut être réduit sur l'électrode.

- à partir du potentiel de décomposition, de légères variations du potentiel déterminent une importante augmentation de l'intensité du courant.

- l'augmentation du courant n'est pas constante. Après qu'un certain potentiel soit atteint, le courant ne varie pratiquement plus; il est dès lors indépendant de la force électromotrice. On atteint alors le courant limite. La courbe a la forme d'un S, d'une "vague".

Si on refait la même expérience, mais avec des concentrations variables en ions, on constate que :

- le potentiel correspondant à la moitié de l'augmentation du courant, potentiel de demi-vague, est constant pour un ion donné, quelle que soit sa concentration (Pl. I, fig 2). Tel est le fondement de l'analyse polarographique qualitative.

- la variation de l'intensité du courant correspondant à la différence entre le courant limite et le courant résiduel est proportionnelle à la concentration de l'ion considéré. L'analyse polarographique quantitative est basée sur ce phénomène.

Explication sommaire du mécanisme :

Lorsque le potentiel de décomposition est atteint, l'ion se décharge sur la cathode. Dès cet instant, on observe le passage d'un courant qui a pour origine un phénomène de réduction. Dans le cas du zinc, par exemple, on peut écrire:



Les ions Zn^{++} se réduisent, ce qui provoque au voisinage de l'électrode une diminution de la concentration des ions Zn^{++} et ce d'autant plus que le potentiel appliqué est plus élevé. Il se produit alors un courant de diffusion qui consiste en un déplacement des ions Zn^{++} de la solution vers l'électrode pour "compenser" les pertes subies lors de la décharge.

On peut démontrer que le courant de diffusion est proportionnel à la différence de concentration entre le liquide entourant l'électrode et le reste de la solution.

Cette différence est d'autant plus grande :

- que le potentiel est plus élevé (jusqu'à une certaine valeur)
- pour un même potentiel, que la concentration initiale de la solution en ions à doser est plus grande.

Ces faits peuvent être expliqués ainsi :

pour une solution de concentration donnée en ions, Zn^{++} par exemple, à partir du potentiel de décomposition, le courant augmente rapidement par suite du dépôt toujours plus important des ions Zn^{++} , ce qui a pour effet d'augmenter la différence de concentration du zinc, entre la région se trouvant à proximité de la cathode et le reste de la solution et, par conséquent, le courant de diffusion. Lorsque le potentiel est tel que les ions Zn^{++} se trouvant à proximité de l'électrode sont déchargés au fur et à mesure de leur arrivée, une nouvelle augmentation du potentiel n'a plus aucun effet sur l'intensité du courant. A partir de cet instant, il n'y a plus de variation dans la différence des concentrations et par conséquent dans l'intensité du courant, si l'on fait abstraction du courant de migration.

Cette méthode polarographique est également applicable aux mesures de respiration, car l'oxygène dissout dans une solution d'électrolyte est réduit à la cathode, et le courant qui passe alors est proportionnel - sous certaines conditions - à la teneur en oxygène de la solution.

Jusqu'en 1931 cette méthode de mesure fut peu employée pour l'étude de la respiration, car la cathode à gouttes de mercure était peu maniable et d'utilisation difficile. Un très grand pas en avant fut fait à cette date, lorsqu'il fut montré que cette électrode pouvait être avantageusement remplacée par une cathode constituée par un fil de platine. Cette innovation rendait la méthode beaucoup plus simple et plus facilement utilisable pour des systèmes biologiques.

Peu de botanistes l'utilisèrent. Seuls BLINKS et SKOW en 1938 (3) employèrent une telle électrode pour l'étude des échanges d'oxygène au cours de la photosynthèse du thalle d'*Ulva* ou des feuilles de *Potamogeton*. Depuis lors les électrodes de platine ont été employées pour déterminer les variations de la tension d'oxygène dans une très grande variété de tissus et de systèmes biologiques, comme les cellules tumorales d'ascites (CHANCE) (6), le ventricule de coeur de rat (STRICKLAND) (54), (PACKER) (44), le cerveau de mammifères (DAVIES et BRONK) (13), les mitochondries de foie (CHANCE

et WILLIAMS) (7), la peau et le muscle humain (MONTGOMERY) (42), l'urine (REEVES et coll.) (48), le sol (LEMON et ERRICKSON) (34), l'eau des océans (CARRITT et KANWISHER) (5), soit à peu près dans tous les domaines biologiques.

A la suite de l'emploi de l'électrode stationnaire de platine par BLINKS et SKOW (3), de nombreuses améliorations, tant dans sa construction que dans ses possibilités, furent apportées. Des micro-électrodes furent mises au point, qui donnaient une réponse rapide pour un champ de diffusion faible (DAVIES et BRINKS) (12), (MONTGOMERY) (42). L'électrode de platine tournante (KOLTHOFF et LAITINIEN) (29), MORGAN et NAHAS) (43), (PACKER) (44) ou l'électrode vibrante présente sur l'électrode fixe l'avantage d'un temps de réponse plus rapide.

Mais pour la plupart de ces électrodes, l'inconvénient majeur résidait dans le fait que les mesures se trouvaient très souvent perturbées par ce que l'on a appelé le vieillissement de l'électrode qui se traduisait par une perte de sensibilité avec le temps, due, en particulier, à l'empoisonnement par les protéines. En effet, très souvent, au cours des mesures, les protéines du milieu venaient contaminer la surface libre du platine, rendant ainsi toute mesure impossible.

Une première amélioration fut apportée par l'emploi des "recessed electrode". Dans de telles électrodes, le tube de verre contenant le fil de platine dépassait légèrement l'extrémité libre de celui-ci. La surface du métal était ainsi protégée de la contamination.

CLARK et ses collaborateurs (9) eurent l'idée d'isoler à la fois anode et cathode derrière une membrane, perméable seulement à l'oxygène, séparant ainsi l'électrolyte de l'électrode de la solution à tester. De plus, de par cet isolement, le courant qui s'établit se trouve confiné à l'intérieur de l'électrode. On peut, dès lors, l'employer pour déterminer la tension en oxygène des gaz ou des liquides non conducteurs. Les membranes utilisées sont parfois des membranes de collodion; mais le plus souvent elles sont en polyéthylène ou en téflon.

Ce dernier perfectionnement permit l'utilisation de telles électrodes à oxygène pour des investigations très variées, en particulier dans le domaine des basses tensions d'oxygène.

C'est ainsi qu'il nous fut proposé par Monsieur le Professeur DUCET, d'étudier la respiration de quelques levures, en nous attachant plus spécialement à l'action des basses tensions d'oxygène sur la respiration, au moyen d'une électrode du type Clark.

C H A P I T R E II

MATERIELS ET METHODES

A - METHODES

La mesure de la respiration a été réalisée par la méthode polarographique, en utilisant une électrode du type Clark. Le schéma de l'ensemble de l'appareillage utilisé est donné dans la planche II.

1) - ELECTRODE.

Elle est constituée - pour la cathode - d'un fil de platine soudé à un tube de verre, l'anode étant formée d'un fil d'argent chloruré. Anode et cathode sont immergées dans une solution de chlorure de potassium (0,1 M) et isolées du milieu contenant les levures par une membrane de polyéthylène. La cathode dont la surface est d'environ 2 mm² est appliquée, en tension, sur la membrane. (Pl. III, fig. 1).

2) - CELLULE DE MESURE.

C'est une "cellule" en verre, représentée sur la figure 2 de la planche III. La partie A, rodée, reçoit l'électrode à oxygène et contient à la partie inférieure un logement pour une toupie en plexiglass qui est entraînée à 1500 t/mn par un agitateur magnétique.

La partie B contient la suspension de levures qui est agitée par la rotation de la toupie au cours des mesures et par les bulles de gaz arrivant par C et D, pendant les périodes d'aération. Le remplissage est fait de telle manière qu'aucune bulle de gaz ne soit présente au voisinage de la membrane de polyéthylène.

3) - CIRCUIT ELECTRIQUE.

Une différence de potentiel de 0,7 volt est maintenue entre les électrodes au moyen d'un rhéostat placé en série avec une pile de 1,5 volt (Pl. IV). La variation de l'intensité du courant passant entre les électrodes provoque, dans un circuit dérivé, une déviation du spot lumineux du galvanomètre. Ce spot lumineux vient exciter la cellule photoélectrique d'un "suiveur de spot" (SEFRAM), couplé avec le galvanomètre. Cette cellule est portée par un chariot mobile sur lequel se trouve également fixé un stylet inscripteur. Les variations de l'intensité du courant sont ainsi enregistrées sur une feuille de papier millimétré se déroulant à vitesse constante.

Nous utilisons un galvanomètre "SEFRAM" dont la sensibilité intrinsèque de $0,7 \times 10^{-9}$ A/ mm est pratiquement doublée lors de l'enregistrement par le "Photodyne SEFRAM".

a) intensité du courant passant entre les électrodes

Les lois d'Ohm nous permettent d'écrire :

$$V_a \quad V_b = i_1 r = i_2 (R + G)$$

$$I = i_1 + i_2$$

D'où

$$i_1 r = i_2 (R + G)$$

$$i_1 = i_2 \frac{(R + G)}{r}$$

$$I = i_2 + i_2 \frac{(R + G)}{r}$$

$$I = i_2 \frac{(r + R + G)}{r}$$

L'intensité I de ce courant, engendré par la réduction de l'oxygène à la cathode, est proportionnelle à la teneur en oxygène du milieu.

Les variations de l'intensité du courant i_2 , qui sont enregistrées sur le suiveur de spot couplé au galvanomètre sous forme d'une **courbe**, sont liées aux variations de la teneur en oxygène du milieu en fonction du temps. En effet, après avoir

saturé le milieu en air, l'arrivée du gaz est interrompue. Les levures utilisant l'oxygène dissout dans le milieu, l'intensité du courant, proportionnelle à la concentration, diminue progressivement atteignant un palier pour des concentrations nulles.

A partir de ces courbes expérimentales qui indiquent les variations de l'intensité du courant passant entre les électrodes en fonction du temps, il est possible d'établir, par le calcul, les courbes relatives aux concentrations en oxygène. Pour passer des unes aux autres, il suffit de connaître la proportionnalité entre l'intensité du courant dans le galvanomètre et la concentration en oxygène. Cette intensité dépend en particulier des résistances du circuit, ce que traduit l'utilisation du galvanomètre à diverses sensibilités.

b) calcul de la teneur en oxygène du milieu à la saturation

Le coefficient de solubilité de l'air dans l'eau, à 25°C est de :

0,03931 g/litre d'eau.

Sachant que dans la composition de l'air, l'oxygène entre pour 20,8 % et qu'une mole d'oxygène pèse 32 grammes, la quantité d'oxygène dissout est :

$$\frac{1 \times 0,03931 \times 20,8}{100 \times 32} = 2,56 \times 10^{-4} \text{ Mole/litre.}$$

Nous pouvons supposer que la solubilité de l'oxygène dans nos milieux est très peu différente de la solubilité dans l'eau.

Lorsque l'on place dans le milieu des microorganismes qui respirent ou lorsque l'on fait barboter de l'azote dans ce même milieu, la teneur en oxygène diminue progressivement jusqu'à atteindre une valeur nulle. Cette variation de la concentration se traduit par une certaine déviation du spot du galvanomètre, déviation qui s'enregistre sous forme d'une courbe comprise entre deux paliers, l'un correspondant à la saturation du milieu, l'autre à l'absence d'oxygène. Cette déviation du spot lumineux correspond à une variation de la teneur en oxygène de $2,56 \times 10^{-4}$ m/l. Par conséquent, un déplacement

de x millimètres du stylet inscripteur équivaudra à une variation de concentration de $2,56 \times 10^{-4}$ m/l et un millimètre à :

$$\frac{2,56 \times 10^{-4} \text{ m/l}}{x}$$

c) calcul du rapport des sensibilités

Considérons les montages suivants :



Nous pouvons écrire :

$$i_1 r_1 = i_2 (R + G)$$

$$i'_1 r'_1 = i'_2 (R' + G)$$

Mais aussi :

$$i = i_1 + i_2 = i'_2 + i'_1$$

Donc :

$$i_2 + i_2 \frac{(R + G)}{r_1} = i'_2 + i'_2 \frac{(R' + G)}{r'_1}$$

$$i_2 \frac{(R + G + r_1)}{r_1} = i'_2 \frac{(R' + G + r'_1)}{r'_1}$$

$$i_2 \frac{(R + G + r_1)}{r_1}$$

$$\frac{i'_2 \frac{(R' + G + r'_1)}{r'_1}}{i'_2 \frac{(R' + G + r'_1)}{r'_1}} = n \quad n \text{ étant le rapport des sensibilités}$$

Si donc pour les résistances r et R , nous avons une correspondance concentration en oxygène-millimètre de papier de x , pour les résistances r' et R' , celle-ci sera de $x.n$, si n est le rapport des sensibilités.

4) - COURBES ETABLIES PAR CALCUL.

La première courbe qu'il nous a paru intéressant d'établir est celle qui donne la variation calculée de la concentration en oxygène en fonction du temps.

Pour tracer de tels graphiques nous avons effectué des "pointages" sur la courbe expérimentale à intervalles de temps égaux. Nous obtenons ainsi une série de points, permettant d'établir la courbe : "variation de la concentration en oxygène en fonction du temps".

Une autre figure importante est celle qui représente la variation de la vitesse de consommation de l'oxygène en fonction de sa concentration.

Cette courbe est obtenue en portant en ordonnées le rapport :

$$\frac{\text{variation de concentration } (\Delta C)}{\text{intervalle de temps } (\Delta t)}$$

et en abscisses les concentrations correspondantes. Ces variations de concentration sont, en fait, des variations moyennes déterminées de la manière suivante;

considérons les tensions successives $C_1, C_2, C_3, C_4 \dots$ pour une concentration donnée C_2 , par exemple, le rapport

$\frac{\Delta C}{\Delta t}$ sera égal à :

$$\frac{(C_1 - C_2) + (C_2 - C_2)}{2} \times \frac{1}{\Delta t}$$

En première approximation, ce rapport $\frac{\Delta C}{\Delta t}$ est la vitesse de respiration pour la concentration C_2 .

Une dernière courbe, dite de normalisation, a été également calculée : au-dessous d'une certaine concentration (concentration critique) la vitesse de respiration commence à décroître. Dans cette région nous exprimons les concentrations et les vitesses de respiration en pour cent de la concentration critique et de la vitesse maximale de respiration. Les données ainsi calculées permettent de tracer la courbe de normalisation, dont la forme permet d'apprécier l'importance de certains facteurs agissant sur la respiration.

B - MATERIEL

Le choix du matériel vivant s'est porté sur des levures fournies par le laboratoire de Microbiologie et Mycologie de la Faculté des Sciences de Lyon. Le choix des souches a été guidé par deux préoccupations principales; à savoir, la sphéricité et la constance relatives de la taille des cellules, ceci afin de pouvoir comparer nos résultats expérimentaux avec les calculs théoriques établis par GERARD.

1) - CULTURE.

Ces microorganismes étaient cultivés en milieu liquide de Wickerham, milieu contenant tous les éléments nécessaires au développement des espèces utilisées et auquel était ajouté, comme source de carbone, du glucose.

L'ensemencement était réalisé aseptiquement dans cent centimètres cubes de milieu, contenus dans une fiole d'erlenmeyer, puis les levures étaient ensuite incubées dans une étuve à agitation, à une température de 25° C environ, pendant trois jours.

Toutefois, il nous a paru intéressant de cultiver certaines espèces sans agitation pendant la période d'incubation afin de tester si l'aération du milieu avait une influence sur le comportement ultérieur de ces microorganismes.

D'autre part nous avons été amené à utiliser du papier d'aluminium plutôt que du coton pour fermer les fioles, afin d'éviter la chute possible de fragments de coton brûlé dans le milieu au cours des différentes manipulations.

2) - SOUCHES UTILISEES.

Sept espèces de levures ont été étudiées :

- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (HANSEN)	souche	LY 300
- <i>Pichia strasburgensis</i> (RAMIREZ et BOIDIN, 1961)	souche	LY 6
- <i>Debaryomyces castelii</i> (CAPRIOTTI 1958)	souche	LY 41
- <i>Debaryomyces fluxorum</i> (PHAFF et KNAPP, 1956)	souche	LY 67
- <i>Debaryomyces bisporus</i> (DEKKER 1931)	souche	LY 1075
- <i>Debaryomyces globosus</i> (KLOECKER 1909)	souche	LY 1077
- <i>Debaryomyces hansenii</i> (LODDER et VAN RIJ, 1952)	souche	LY 10

Milieu de Wickerham :
pour un litre :

- eau distillée	:	900	g	- (NH ₄) ₂ SO ₄	:	5	g
- Mg SO ₄	:	0,5	g	- glucose	:	10	g
- Ca Cl ₂	:	0,1	g	- acides aminés	:	0,05	g
- Na Cl	:	0,1	g	- vitamines	:	2	cm ³
- KH ₂ PO ₄	:	1	g	- éléments traces:	:	1	cm ³

mais nous ne rapporterons en détail que les résultats relatifs aux trois derniers Debaryomyces qui assimilent assez rapidement le glucose (ABADIE et coll.) (1).

3) - PREPARATION DES LEVURES.

Lorsque la croissance de ces microorganismes est jugée suffisante, environ trois jours après l'ensemencement, ceux-ci sont rassemblés par centrifugation ménagée. Après avoir été centrifugés et lavés trois fois de façon à éliminer le milieu de culture, ils sont finalement mis en suspension dans du milieu neuf, dépourvu de glucose, afin de réaliser une suspension à 5 % (poids frais/volume). C'est à partir de celle-ci qu'est prélevé l'échantillon placé dans la cellule de mesure.

4) - EXPERIENCES REALISEES.

Pour une même espèce de levures, plusieurs manipulations sont effectuées.

Les premières portent sur un échantillon de 3 cm³ de suspension (i.c. 25 mg. poids sec) placé dans 25 cm³ de milieu de Wickerham non glucosé, maintenu à 25° C.

Après aération pendant le temps nécessaire pour que l'équilibre thermique soit atteint, une première courbe est réalisée par cessation de l'aération, permettant de déterminer, grâce à sa pente, une vitesse initiale de respiration pour l'espèce étudiée.

Le milieu est alors de nouveau aéré, puis l'aération arrêtée, afin de suivre la variation de cette vitesse de respiration en fonction de la durée de l'aération.

Du glucose est alors ajouté au milieu et l'enregistrement de la respiration est réalisé immédiatement, puis après aération pendant des temps variés.

Ces manipulations sont faites à la fois sur des espèces incubées dans du milieu de Wickerham glucosé agité, et sur ces mêmes espèces cultivées sans agitation.

Nous avons réalisé d'autres expériences en utilisant seulement 1 ml. de suspension de levures à 5 %, poussées en milieu agité. Après avoir déterminé, comme précédemment, l'influence de l'aération sur la respiration de ces microorganismes placés dans un milieu non glucosé, le sucre est ajouté par apports successifs.

C - CRITIQUE DES METHODES

Des critiques peuvent être formulées sur les conditions de culture du matériel vivant ainsi que sur les méthodes de mesure de la respiration.

1) - MATERIEL VIVANT.

Nous avons renoncé à tenter la réalisation de cultures synchrones non seulement à cause des difficultés pratiques d'obtention, mais aussi à cause du fait que nos manipulations portant sur des temps de l'ordre de 8 à 10 heures, le synchronisme initial risquait de céder le pas à un développement désordonné des cellules. Dans ces conditions, la comparaison des résultats expérimentaux aurait été encore plus difficile.

2) - MESURE DE LA RESPIRATION.

a) électrode.

Le passage du courant correspond à une décomposition de l'oxygène et on peut admettre que 96.500 coulombs libèrent 1 molécule d'oxygène.

Les courants enregistrés sont, pour la saturation en oxygène, de l'ordre de 10^{-6} ampère, ce qui entraîne la disparition d'une quantité d'oxygène inférieure à 0,8 μ l/h.

b) agitation.

Pour avoir des mesures correctes, il est nécessaire d'agiter le milieu au voisinage de l'électrode. Il se peut que cette agitation favorise une certaine diffusion de l'air dans celui-ci. Pour diminuer cet effet, un bouchon a été placé au sommet de la branche libre de la cellule de mesure (Pl. II).

c) enregistrement.

Nous avons vu que les courbes expérimentales doivent être transformées et que des "pointages" sont nécessaires pour déterminer les concentrations successives du milieu en oxygène. De tels pointages sont faits au quart de millimètre près. Dès lors, si la précision des mesures relatives aux fortes concentrations en oxygène est bonne, elle est plus faible pour les basses tensions.

D'autre part, les courbes expérimentales représentant les variations de l'intensité du courant ne se trouvent pas toujours enserrées entre deux droites parallèles. En effet, si, pour la saturation du milieu en oxygène, on obtient effectivement un palier stable, il arrive parfois que pour une concentration nulle, l'intensité du courant décroît progressivement au lieu de demeurer constante.

Dans de tels cas, la concentration nulle est déterminée par extrapolation, en prenant pour palier, la tangente à la "ligne de fuite".

Pour atténuer ces imprécisions dans les calculs des concentrations en oxygène, nous avons cherché à obtenir à chaque fois non pas un, mais trois enregistrements successifs de la variation de la concentration de ce gaz. Ceci nous a permis de déterminer des concentrations moyennes, les trois enregistrements successifs étant semblables (voir pl. VI).

Debaryomyces bispbrus LY 1075

Quant.levu.	Aération		Glucose	$V_m \times 10^{-6}$	$K_m \times 10^{-6}$	Conc.cri $\times 10^{-6}$
	par.	tot.		Mol./l/s	Mol./l/s	Mol./l/s
	12'			0,255	0,8	5
3 ml	12'	12'		0,130		
(poids sec			100 mg	0,764	1,7	9
25 mg.)	45'	57'		0,830	1,8	9
agitation	45'	102'		0,987	2,0	8
				0,113	0,8	3
3 ml	25'	25'		0,106		
(p.s. 25 mg)	30'	55'	100 mg	0,390	1,15	6
sans agita-	19'	74'		0,520	1,58	7
tion.	20'	94'		1,0	1,8	7
				0,042	0,25	0,9
			2 mg			
1 ml	11'	11'		0,365	0,8	3
(p.s. 8 mg)	55'	66'	4 mg	0,99	1,9	4
agitation	15'	81'		0,624	1,25	3,4
	34'	115'	6 mg	1,29	2,65	6
	32'	147'		0,34	0,65	5

Tabl. I

Les valeurs expérimentales de Vm et de Km respectivement, sont données dans le tableau I.

L'examen de celles-ci, montre qu'une aération prolongée du milieu non glucosé provoque une diminution de la vitesse maximale, ceci à la fois pour les levures ayant subi une agitation pendant la période d'incubation et pour celles cultivées dans un milieu non agité.

L'addition d'une certaine quantité de glucose (100 mg) provoque une nette augmentation de la vitesse maximale. Si, à la suite de cet apport de sucre, le milieu est de nouveau aéré, il s'en suit une nouvelle augmentation de la vitesse maximale. Le Km varie lui-aussi dans le même sens.

Si nous observons les résultats obtenus avec 1 ml de suspension de levures, nous constatons qu'ici encore l'aération provoque une diminution de la vitesse maximale.

Avec l'apport de quantités successives de sucre nous observons une augmentation importante de Vm et de Km.

Mais, contrairement à ce que nous avons vu précédemment, le barbotage d'air dans le milieu, à la suite d'un apport de sucre, entraîne un abaissement sensible de la valeur de Vm.

Ces résultats nous conduisent à penser que ces microorganismes consomment rapidement le glucose. Lorsque celui-ci se trouve dans le milieu en forte concentration (0,4 %), les levures disposent, pendant longtemps, d'une réserve de sucre et voient ainsi leur vitesse de respiration augmenter à chaque aération.

Par contre, lorsque le milieu ne contient que peu de sucre (0,008 à 0,04 %) ce dernier est consommé rapidement, et la vitesse de respiration des microorganismes va cette fois diminuer avec l'aération.

2°) - Debaryomyces globosus KLOEKER 1909 - Souche LY 1077.

Chez cette espèce nous constatons aussi qu'une aération prolongée du milieu dépourvu d'aliments carbonés entraîne un très net affaiblissement de la vitesse de respiration (Pl. VII).

Comme précédemment, l'addition de 100 mg de glucose provoque une reprise très importante de la consommation d'oxygène, d'autant plus rapide que le milieu est plus aéré.

Si cet aliment sucré est fourni par apports successifs, nous constatons que chaque apport est suivi d'une nette augmentation de la vitesse maximale et en général aussi de Km.

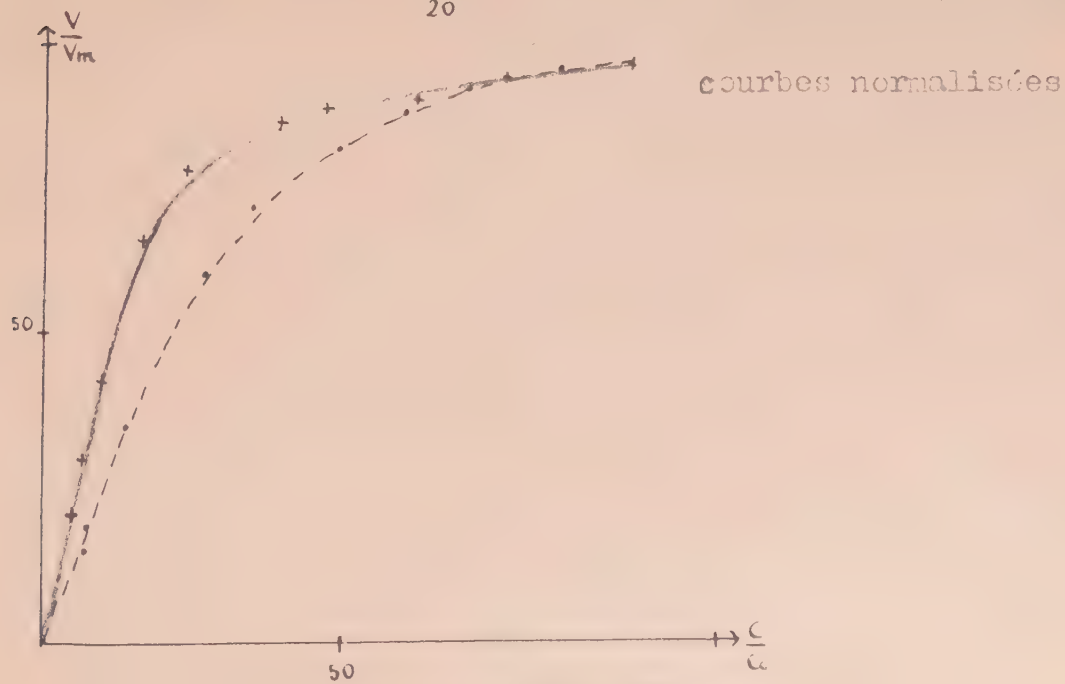
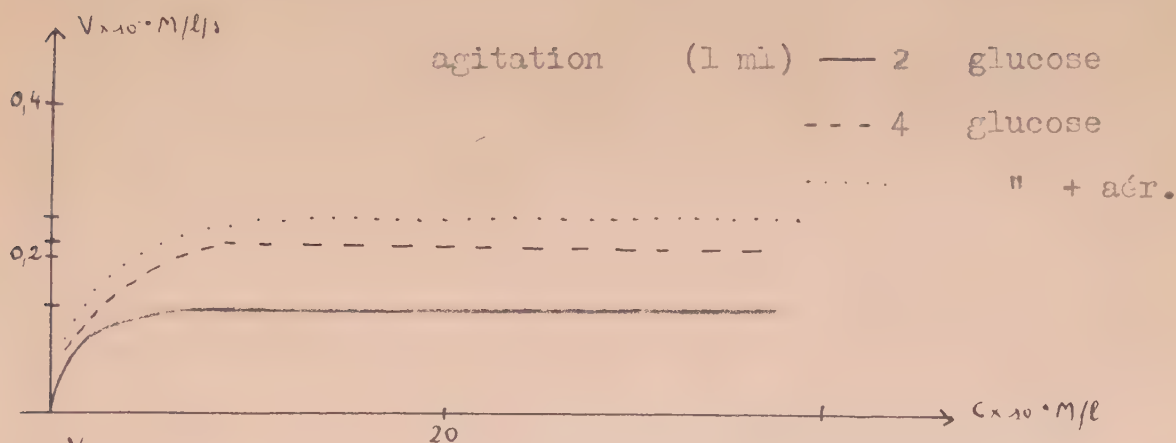
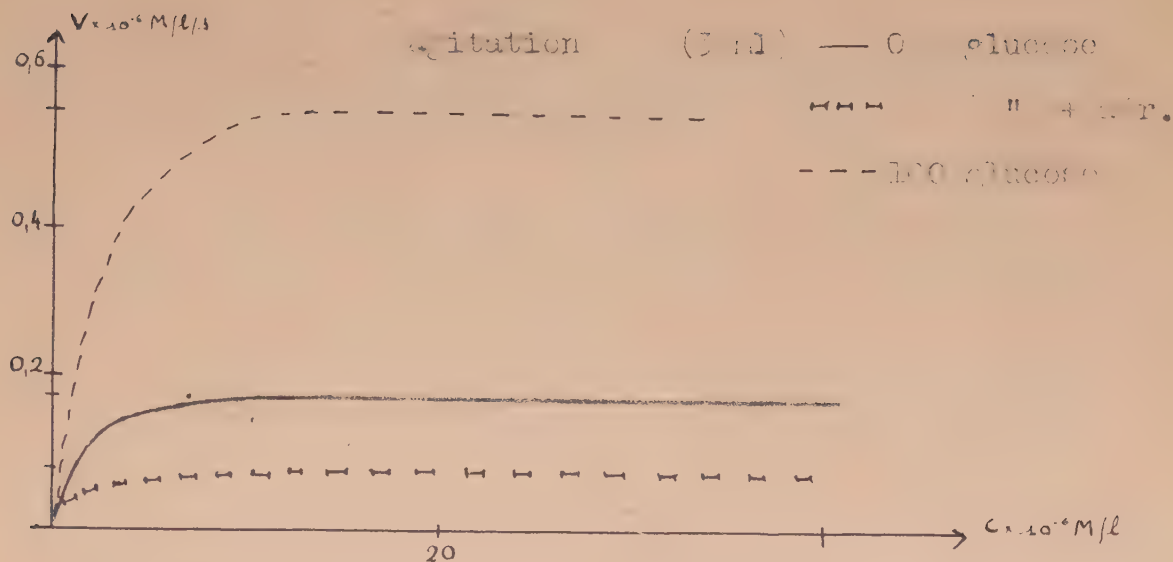
Mais contrairement à D. bisporus, une aération poussée du milieu à la suite d'une addition de glucose, ne provoque pas d'abaissement de la vitesse de respiration.

On peut penser que, chez cette espèce, l'utilisation du glucose est relativement lente.

Debaryomyces globosus LY 1077

Quant.levu.	Aération		Glucose	$V_m \times 10^{-6}$	$K_m \times 10^{-6}$	Conc.cri
	par.	tot.		Mol./l/s	Mol./l/s	$\times 10^{-6}$ Mol./l/s
				0,184	1,25	12,8
3 ml	20'	20'		0,080		
(p.s. 25 mg)			100 mg	0,556	2,1	12
agitation	60'	80'		0,845	2,25	11,7
	35'	115'		1,03	2,7	12
				0,250	1,9	4
3 ml	17'	17'		0,174		
(p.s. 25 mg)	15'	32'	100 mg	0,420	2	10
sans agita-	58'	90'		0,600	2,7	10
tion	45'	135'		0,774	3,1	9,5
				0,06		
	3'			0,05		
1 ml			2 mg	0,133	0,8	8
(p.s. 8 mg)	8'	11'		0,160	1,0	6
agitation	43'	54'	4 mg	0,216	1,8	11
	35'	89'		0,244	1,9	10
	25'	114'	8 mg	0,262	1,65	7
	40'	154'		0,335	1,9	10

Tabl. II



3°) - Debaryomyces hansenii LODDER et VAN RIJ 1952 -

Souche LY 10.

Nous pouvons encore remarquer que ces microorganismes voient leur respiration diminuer fortement à la suite d'une aération prolongée du milieu.

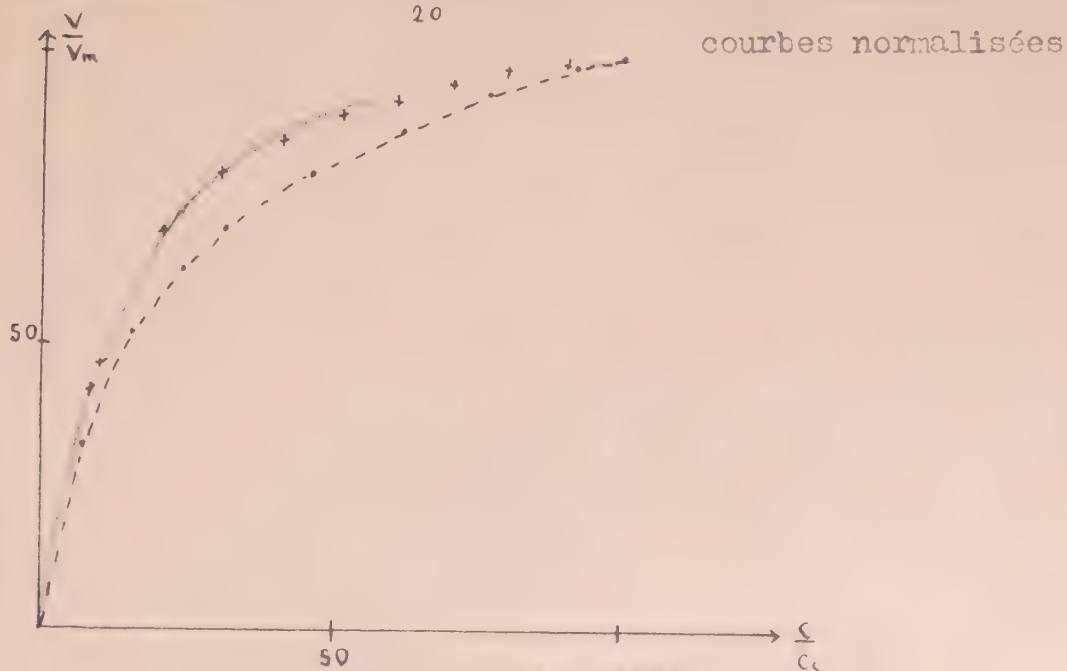
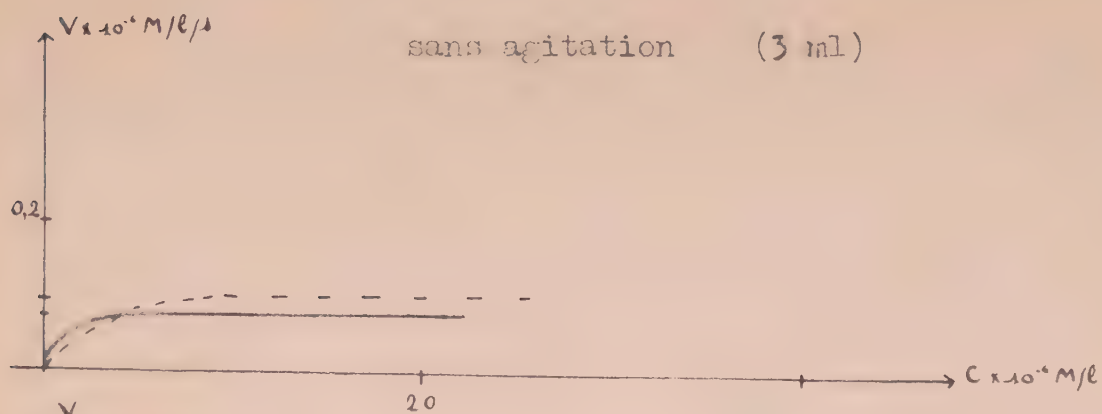
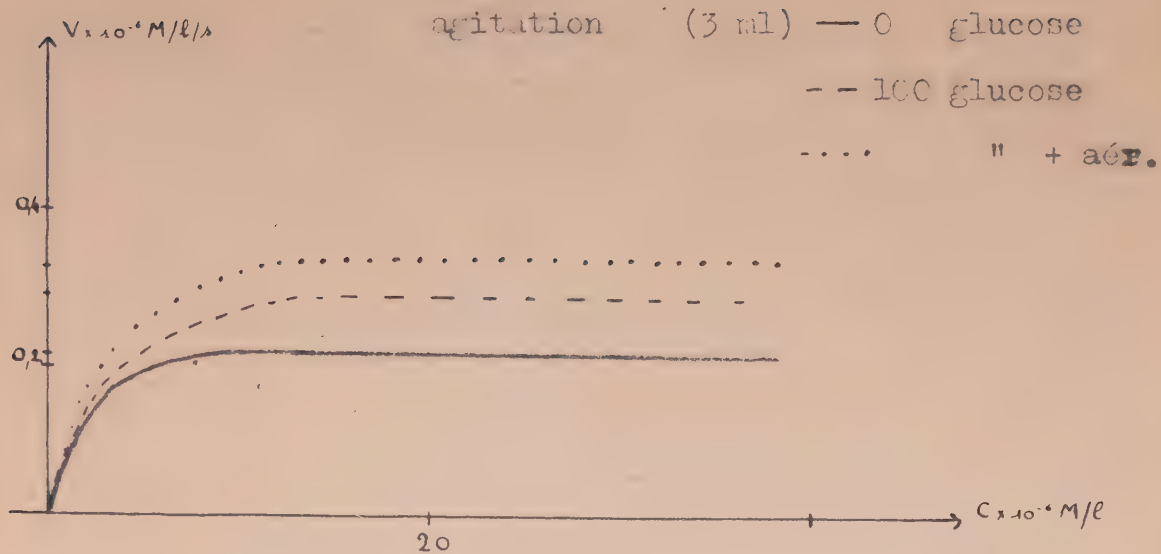
Mais cette espèce présente une particularité qui la différencie des précédentes. Il semble que D. hansenii supporte difficilement une vie partiellement anaérobie. En effet, la vitesse de respiration initiale est très faible et de plus, l'examen au microscope de telles cellules nous a montré des microorganismes paraissant différents de ceux obtenus dans un milieu agité. Le contenu cellulaire en est beaucoup plus granuleux et plus réfringent.

L'examen des valeurs de V_m et de K_m , obtenues pour 1 ml de suspension de levures, nous montre, en accord avec les résultats précédents, qu'un apport de glucose entraîne une augmentation de la vitesse maximale. L'aération du milieu, à la suite de l'addition de sucre, provoque une nette reprise de la consommation d'oxygène.

Debaryomyces hansenii LY 10

Quant.levu.	Aération		Glucose	$V_m \times 10^{-6}$	$K_m \times 10^{-6}$	Conc.cri
	par.	tot.		Mol./l/s	Mol./l/s	$\times 10^{-6}$ Mol./l/s
				0,296		
	10'	10'		0,210	1,2	10
3 ml	45'	55'		0,190		
(p.s. 25 mg)	50'	105'		0,180		
agitation			100 mg	0,294	1,9	13
	75'	180'		0,320	1,9	9
				0,066	0,6	5
3 ml	3'	3'		0,077		6
(p.s. 25 mg)	3'	8'		0,08		
sans agita-			100 mg	0,097	1,9	8
tion	34'	40'		0,085	2,7	9
	11'	51'		0,11	3,8	11
				0,113		
1 ml	6'	6'		0,075		
(p.s. 8 mg)	9'	15'	2 mg	0,135	0,8	6,3
agitation	11'	26'		0,157	1,1	6
	4'	30'	4 mg	0,200	1,2	6
	14'	44'		0,251	1,2	5
	4'	48'	10 mg	0,255	1,4	7

Tabl. III



C H A P I T R E I V

DISCUSSION

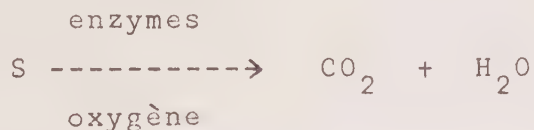
Nos résultats expérimentaux permettent de mettre en évidence divers facteurs pouvant agir sur la respiration.

1°) - Influence d'une aération prolongée sur la respiration des levures placées dans un milieu non glucosé.

A la suite d'un barbotage prolongé d'air, la vitesse maximale de respiration décroît de manière importante, ce que nous pouvons expliquer ainsi:

les microorganismes se trouvant dans un milieu riche en oxygène respirent activement et, comme ils ne disposent d'aucune source externe d'énergie, la respiration se fait aux dépens des réserves intracellulaires. Plus l'intensité respiratoire est élevée, plus vite ces matériaux sont utilisés. Lorsque ceux-ci sont épuisés ou de plus en plus difficilement mobilisables, la consommation d'oxygène diminue progressivement. C'est à cette utilisation des réserves, connue depuis longtemps aussi bien chez *Aspergillus niger* (KOSINSKI) (30) que chez les levures (GEIGER-HUBER) (22) que STIER et STANNARD (53) ont donné le nom de respiration endogène.

Si un substrat S est métabolisé au cours de cette période, nous pouvons schématiser l'ensemble des phénomènes sous la forme suivante :



Cette relation simplifiée montre que la concentration en substrat peut limiter - sous certaines conditions - la vitesse de consommation de l'oxygène.

Si nous admettons qu'une relation puisse exister entre la taille des cellules et la somme totale des réserves emmagasinées, nous pouvons alors penser que des cellules de taille sensiblement identique, présenteront des variations de la vitesse maximale comparables, pour une aération semblable, en supposant toutefois que cette respiration endogène se fasse aux dépens d'un même substrat, le glycogène par exemple (HARDEN et YOUNG) (24).

Par contre, pour des cellules de taille plus réduite, cette variation de la vitesse de respiration sera beaucoup plus forte.

Le tableau IV montre qu'une telle relation semble exister, compte tenu du fait que le temps d'aération n'est pas rigoureusement le même et que certaines espèces ont des dimensions cellulaires très voisines mais non identiques.

Tableau IV

Levure utilisée (3ml, agitation)	Ø	Vm initiale x 10 ⁻⁶ Mole/l/s	Durée aération	Vm-6 x 10 ⁻⁶ Mole/l/s	Vmi Vm.
Debaryomyces bisorus	5 µ	0,225	12'	0,131	1,7
Debaryomyces globosus	4,7 µ	0,184	14'	0,148	1,24
Debaryomyces hansenii	5 µ	0,296	10'	0,210	1,4
Debaryomyces fluxorum	4,8 µ	0,195	15'	0,139	1,4
Pichia strasburgensis	3 µ	0,400	3'40 6'	0,235 0,148	1,7 2,7

2°) - Relation possible entre vitesse maximale de respiration et concentration en cellules.

Nos résultats expérimentaux - pour autant que l'on puisse comparer des résultats obtenus au cours d'expériences qui, bien que réalisées toujours dans les mêmes conditions, ne se sont pas déroulées simultanément mais successivement - laissent penser qu'une proportionnalité existe entre V_m et concentration en cellules, si l'on ne retient que la vitesse maximale initiale.

En effet, nous avons pu obtenir les résultats suivants:

- <u>D. globosus</u>	3 ml (agitation) V_m init. :	$0,184 \times 10^{-6}$	M/l/s.
	1 ml (agitation) V_m init. :	$0,06 \times 10^{-6}$	M/l/s.
- <u>D. hansenii</u>	3 ml (agitation) V_m init. :	$0,296 \times 10^{-6}$	M/l/s.
	1 ml (agitation) V_m init. :	$0,113 \times 10^{-6}$	M/l/s.
- <u>D. fluxorum</u>	3 ml (agitation) V_m init. :	$0,65 \times 10^{-6}$	M/l/s.
	1 ml (agitation) V_m init. :	$0,2 \times 10^{-6}$	M/l/s.

Ces résultats sont en accord avec ceux de HEGNER et GLOSSMANN (25) qui écrivent que "pour une même température, la vitesse maximale de respiration est proportionnelle à la concentration en mitochondries ou en cellules". De même, MITSUDA (40) et ses collaborateurs ont montré que pour des mitochondries isolées, à l'intérieur de certaines limites de concentrations, "la vitesse de respiration est proportionnelle aux quantités de mitochondries".

3°) - Action du glucose sur la respiration.

Nous avons réalisé deux types de manipulation :

- a - apport important (100 mg) et unique de glucose .
- b - apports fractionnés de petites quantités de glucose (2 mg, 4 mg, 6 mg, 8 mg ou 10 mg) .

a - Addition unique de glucose pour des levures incubées en milieu agité.

Chez toutes les espèces étudiées, cet apport de sucre entraîne immédiatement une nette augmentation de V_m et de K_m . Par contre, si nous essayons de déterminer, pour chaque espèce testée, la concentration critique, nous constatons que les levures utilisées peuvent se classer en deux groupes :

dans le premier nous trouvons des espèces comme Debaryomyces globosus et D. castellii, pour lesquelles la concentration critique ne varie pas de façon significative à la suite de l'addition de sucre.

Il est à remarquer que chez ces deux espèces la vitesse maximale de respiration atteinte juste avant l'addition de glucose est très faible ($0,08 \times 10^{-6}$ M/l/s pour D. globosus; $0,03 \times 10^{-6}$ M/l/s pour D. castellii). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'inanition entraîne des modifications temporaires dans la physiologie de ces microorganismes.

Dans l'autre groupe, se rangent D. bisporus, D. hansenii, Pichia strasburgensis, Saccharomyces cerevisiae, pour lesquelles un apport de sucre entraîne une augmentation de la valeur de la concentration critique.

Chez ces dernières espèces, la vitesse maximale, antérieure à l'addition de sucre, est notablement plus élevée que chez les précédentes (de l'ordre de $0,11$ à $0,22 \times 10^{-6}$ M/l/s).

On peut alors se demander si la vitesse de respiration se trouve limitée seulement par la teneur en glucose ou par la teneur en oxygène dissout du milieu. L'aération, à la suite de l'addition de sucre, provoque une nouvelle augmentation de V_m et de K_m . Nous pouvons donc penser que ce n'est pas la seule concentration en sucre qui vient limiter la respiration mais également la concentration en oxygène. En effet, le glucose provoque une nette reprise de l'activité métabolique. Respirant plus activement ces microorganismes consomment alors rapidement l'oxygène, et deviennent en peu de temps sensibles à la concentration de ce gaz dans le milieu.

Chez la plupart des espèces étudiées, l'aération suivant l'apport de sucre, ne provoque pas de variations notables dans la concentration critique. Cependant, une aération prolongée semble diminuer la valeur de celle-ci chez Pichia strasburgensis et Debaryomyces hansenii, tout en augmentant Vm. Mais il est possible que ces derniers résultats soient dus à l'imprécision de la mesure de la concentration critique.

B - Additions successives de glucose.

Chaque apport de sucre provoque une augmentation de Vm et de Km, ceci pour l'ensemble des espèces étudiées.

Dans la plupart des cas, la concentration critique augmente également.

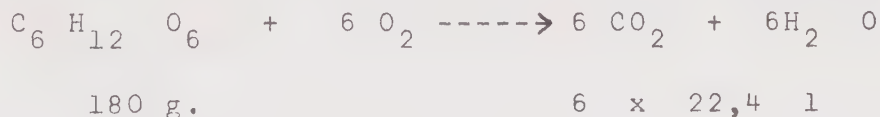
Lorsqu'une aération importante est réalisée après l'addition de faibles quantités de glucose, nous observons que, chez certaines espèces, la vitesse maximale décroît ainsi que la concentration critique. C'est le cas de D. bisporus et P. strasburgensis.

Lorsque l'aération est ménagée, chez P. strasburgensis, Vm et concentration critique augmentent.

Chez les autres espèces, le barbotage d'air entraîne une accélération de la vitesse de respiration alors que la concentration critique ne semble pas modifiée de façon significative.

Ceci conduit à penser que chez certaines levures, la teneur en sucre et la teneur en oxygène interviennent pour limiter la respiration.

D'autre part un calcul approché permet d'apprécier le temps nécessaire pour une oxydation complète du glucose apporté:



Considérons le cas où 4 mg. de sucre sont ajoutés à 25 cm³ de milieu contenant en suspension 1 ml. de l'espèce Debaryomyces bisporus.

La quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder une telle quantité de glucose est de :

$$\frac{6 \times 22,4 \times 4}{180 \times 10^3} \quad \text{litre}$$

En une minute les levures consomment :

$$\frac{0,99 \times 25 \times 60 \times 22,4}{10^6 \times 10^3} = \frac{3330}{10^8} \quad \text{litre}$$

Pour oxyder tout le sucre en CO₂ et H₂O il faudrait:

$$\frac{6 \times 22,4 \times 4 \times 10^8}{180 \times 10^3 \times 3330} = 90 \text{ minutes}$$

Après 15 minutes d'aération, une quantité appréciable de sucre a été utilisée au cours de la respiration, et, d'autre part, du glucose doit servir à reconstituer les réserves, ce qui explique la diminution de respiration enregistrée.

Chez les autres espèces, la vitesse d'utilisation du sucre semble moins rapide.

4°) - Effet de l'agitation du milieu pendant l'incubation.

a - activation de la multiplication préalable.

Nous avons observé que la quantité totale de levures récoltée après incubation dans un milieu non agité est faible, comparée à celle obtenue en milieu agité (Debaryomyces hansenii 0,88 g. contre 1,8 g; D. globosus 1,40 g contre 2,40 g).

b - transformation des cellules.

La comparaison des vitesses maximales de respiration des différentes espèces incubées avec ou sans agitation du milieu montre que l'anaérobiose relative au cours de l'incubation entraîne un ralentissement de la consommation d'oxygène dans les expériences subséquentes.

Cependant, deux levures font exception, Debaryomyces castelli et D. globosus. Il faut souligner toutefois que D. castelli, bien qu'incubée avec agitation, présente une vitesse initiale de respiration anormalement faible, comparée à celle obtenue pour les autres microorganismes.

Le ralentissement de la respiration s'accompagne d'une diminution de la valeur de la concentration critique.

L'apport du glucose, suivi d'une aération, provoque une augmentation de la vitesse de respiration. Ceci est tout à fait comparable à ce que nous observons pour les différentes espèces cultivées en milieu agité, ce qui laisse penser qu'un retour à l'état normal s'effectue rapidement.

Ce retour à une activité métabolique normale se traduit également par le fait que la multiplication cellulaire reprend à un rythme élevé. En effet, des mesures de densité optique, réalisées en cours d'expérience, nous montrent que celle-ci augmente assez rapidement en fonction du temps.

Pour D. bisporus, incubée sans agitation, nous avons obtenu les résultats suivants, en nous plaçant à 350 mμ, région du spectre où l'absorption est maximale :

- à 12 h.	pour 350 mμ	D.O.	10,8	x	10 ⁻²
- à 15 h.	pour 350 mμ	D.O.	17	x	10 ⁻²
- à 16 h.30	pour 350 mμ	D.O.	20	x	10 ⁻²

Ces résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs qui - aussi bien du point de vue morphologique que physiologique - notent des différences importantes entre les cellules développées en aérobiose et anaérobiose.

Chez Torula utilis, LINNANE (36) et ses collaborateurs montrent que, si une grande partie des organites cellulaires est identique chez des individus ayant proliféré avec ou sans oxygène, il n'en est pas de même des mitochondries. En effet, ces auteurs signalent l'absence d'éléments intracellulaires présentant une structure de mitochondries dans le cas d'une anaérobiose stricte. D'autre part, l'examen au microscope électronique d'un grand nombre de coupes faites dans des cellules de Torula développées sans oxygène révèle l'existence d'un système abondant de "membranes" non encore observé chez les levures.

Essayant d'obtenir une fraction mitochondriale à partir de celles développées en anaérobiose, ces auteurs n'obtiennent que des fragments du système de membranes. Avec la même technique, mais en utilisant cette fois des microorganismes incubés en présence d'oxygène, ils observent de véritables mitochondries.

POLAKIS, BARTLEY et MEEK (47) rapportent des observations semblables pour Saccharomyces cerevisiae.

Depuis longtemps déjà, chez cette levure, SLONIMSKI (51) a signalé que l'examen spectroscopique de cellules en anaérobiose montre des changements profonds dans leur système cytochromique.

LINDENMAYER et SMITH (35) trouvent des faits analogues chez les levures de boulangerie et de brasserie. "En aérobiose, elles possèdent un système respiratoire similaire aux mitochondries de mammifères. Par contre, ces mêmes levures incubées en anaérobiose montrent seulement une faible activité respiratoire. Les cellules cultivées en aérobiose synthétisent les cytochromes $a-a_3$, b , c et c_1 . En anaérobiose, on rencontre des pigments du même groupe, mais dont les bandes d'absorption se trouvent à des longueurs d'onde différentes". Ces cytochromes ont reçu le nom de a_1 et b_1 .

Ces auteurs signalent également que certaines déshydrogénases ne se rencontrent pas chez des cellules développées en absence d'oxygène.

SLONIMSKI a montré de plus que si des cultures obtenues en anaérobiose sont aérées, elles donnent rapidement des colonies de cellules présentant des spectres classiques. Il démontre aussi qu'une croissance en anaérobiose de courte durée n'introduit pas dans la population cellulaire d'hétérogénéité génétique, et que la perte des enzymes respiratoires n'est pas héréditaire. Cet auteur signale également que l'apport d'oxygène à des cellules ayant proliféré en absence d'air provoque une apparition du cytochrome c , et une disparition des cytochromes b_1 et c_1 . Dans le même temps, il y a augmentation de la capacité respiratoire.

TUSTANOFF et BARTLEY (55) rapportent également des résultats similaires.

5) - Influence de la tension d'oxygène.

En dessous de la concentration critique d'oxygène, la respiration diminue d'intensité et les causes de cette diminution peuvent "à priori" être multiples.

a - action enzymatique.

Nous avons déjà fait remarquer la similitude de forme entre nos courbes et celles correspondant à la variation de la vitesse de disparition d'un substrat en fonction de sa concentration dans une réaction enzymatique.

Dans nos courbes, le palier correspond à une réaction d'ordre zéro ($\frac{dc}{dt} = \text{cte}$) et pour les concentrations moyennes et faibles, nous avons - semble-t-il - une relation hyperbolique.

Avec les hypothèses posées par MICHAELIS et MENTEN (39) ou par BRIGGS et HALDANE (4), la vitesse d'une telle réaction enzymatique est donnée par l'équation suivante :

$$v = \frac{V_m S}{K_m + S}$$

dans laquelle

v	représente la vitesse observée
V _m	représente la vitesse maximum de la réaction
S	représente la concentration en substrat
K _m	représente une constante ayant les dimensions d'une concentration

Cette équation peut être transformée de diverses manières. Par exemple :

$$(1) - \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m}$$

$\frac{1}{v}$ est fonction linéaire de $\frac{1}{S}$

$$(2) \quad - \frac{S}{v} = \frac{K_m}{V_m} + \frac{S}{V_m}$$

$\frac{S}{v}$ est fonction linéaire de S.

Nous avons choisi cette dernière transformation, peut-être moins classique, car elle rend le tracé des courbes plus facile, pour les faibles concentrations.

Si nous avons affaire à une réaction enzymatique simple, les valeurs de S et v trouvées expérimentalement devraient, après transformations, donner des courbes représentatives qui seraient des droites.

Dans nos essais, pour les fortes concentrations en oxygène, les différents points calculés se trouvent sur une droite passant par l'origine des coordonnées. Mais pour les faibles tensions en oxygène, pour lesquelles la vitesse de respiration se trouve limitée, les points déterminés à partir de nos valeurs expérimentales s'écartent notablement de la droite précédemment obtenue (pl. IX). Certains points même se trouvent très en-dessus d'une telle courbe, ceci pour les très faibles concentrations (en dessous de 10 % de la concentration critique). En fait, pour ces dernières conditions, de tels écarts semblent dûs aux imprécisions des mesures : comme nous l'avons déjà signalé, la détermination, à partir des courbes expérimentales, des très faibles concentrations en oxygène, est toujours entachée d'une forte erreur relative ce qui cause une grande indétermination pour la valeur du rapport $\frac{C}{v}$.

De plus, si nous portons sur une courbe les valeurs de K_m en fonction de celles de V_m , nous constatons qu'il semble y avoir une relation sensiblement linéaire entre ces différentes valeurs (pl. IX). Ceci laisse penser que le facteur limitant la vitesse de respiration pour les faibles tensions d'oxygène n'est pas simplement d'ordre enzymatique, car, s'il en était ainsi, K_m devrait être constant.

réduction du cytochrome a_3 par spectroscopie. Pour de fortes tensions d'oxygène les vitesses de respiration, d'apparition du fumarate et le degré de réduction du cytochrome demeurent constants. Lorsque la concentration critique est atteinte, la respiration est ralentie, de même que la transformation succinate-fumarate. Le cytochrome a_3 est également plus réduit. Dans ces conditions, la vitesse a_3 de respiration, pour les faibles tensions d'oxygène, se trouve limitée par la réduction de plus en plus prononcée de la chaîne des cytochromes.

Toutefois, CHANCE trouve que l'oxydase terminale est plus sensible à la tension d'oxygène que ne l'est la vitesse de respiration. Il explique cette contradiction en admettant que chez les Mammifères, il y a un large excès de cytochrome oxydase. Son niveau d'oxydation peut varier considérablement en permettant néanmoins à une quantité suffisante de la forme réduite d'assumer les processus respiratoires, sans changements notables dans la vitesse de respiration.

Mais cet effet protecteur ou tampon dans la chaîne des cytochromes, s'il est signalé chez les Mammifères, n'est pas forcément présent chez les levures, même s'il a été invoqué pour expliquer la résistance à l'oxyde de carbone de la respiration des végétaux supérieurs (DUCET et ROSENBERG) (16).

D'autres auteurs ont également cherché si la vitesse de respiration est limitée au niveau de la chaîne des cytochromes.

REYES et NEVILLE (49) utilisent des mutants de Neurospora crassa, qui ne possèdent qu'en faible quantité un composant normal de la chaîne des cytochromes. Ils comparent les concentrations critiques relevées pour de tels mutants avec celles observées pour des individus normaux. Ils ne trouvent aucune différence significative entre les deux. Ces auteurs estiment que la diminution de la concentration des cytochromes est insuffisante pour changer la concentration critique d'oxygène. Ils pensent que - à défaut de l'intervention du degré d'oxydation ou de réduction du système des cytochromes - la limitation de la vitesse de respiration pour les faibles tensions d'oxygène est due à la vitesse de transfert de ce gaz du milieu ambiant jusqu'à son point d'utilisation, au niveau des mitochondries. (CHANCE et d'autres auteurs ont montré que les constituants de la chaîne respiratoire se trouvent attachés à la structure interne de celles-ci).

Dans ces conditions on peut se demander si ce n'est pas la diffusion de l'oxygène à l'intérieur de la cellule qui vient limiter la vitesse de respiration.

b - diffusion de l'oxygène.

Depuis longtemps déjà de nombreux auteurs se sont préoccupés du problème de la diffusion de l'oxygène dans les tissus et les cellules. Certains se sont plus particulièrement attachés à l'étude mathématique de ce phénomène. C'est le cas de KROGH (31) qui a déterminé des valeurs du coefficient de diffusion; de WARBURG (56) qui a établi une relation pour une coupe de tissu, entre la tension d'oxygène, la respiration, le coefficient de diffusion et l'épaisseur de la coupe; de FENN (18), de GERARD (20) (21) qui ont trouvé des équations analogues s'appliquant à la diffusion dans de nombreux systèmes. HILL (28) a développé plusieurs formules tendant à expliciter les phénomènes rencontrés aussi bien à l'état d'équilibre qu'à l'approche de celui-ci. LONGMUIR (38) a pensé que la relation de WARBURG s'appliquait également à des cellules isolées et aux mitochondries, pour des tensions en oxygène supérieures à la concentration critique.

Nous avons plus spécialement utilisé les développements mathématiques établis par GERARD (21) pour des cellules sphériques isolées et DUCET et PENELOUX (15) pour les tissus végétaux.

A équilibre dynamique la quantité d'oxygène qui diffuse à l'intérieur d'une cellule est égale à celle consommée pendant le même temps. Par unité de temps, la diffusion dépend de la surface ($4\pi r^2$ pour une sphère), du coefficient de diffusion D , et du gradient de concentration d'oxygène $\frac{dC}{dr}$,

C étant la concentration au rayon r .

Dans le cas d'une sphère de rayon r , la consommation d'oxygène est égale au produit de la consommation par unité de volume A , par le volume $\frac{4}{3} \pi r^3$.

A l'équilibre nous avons donc :

$$4\pi r^2 D \frac{dC}{dr} = \frac{4}{3}\pi r^3 A$$

$$(1) \text{ ou } \frac{dC}{dr} = \frac{A r}{3 D}$$

En intégrant, nous avons :

$$C = \frac{A r^2}{6 D} + K$$

Si $r = 0$, $C = K$, K représentant la concentration en oxygène au centre de la cellule.

Pour la concentration critique, lorsque la concentration en oxygène au centre de la sphère atteint zéro, $K = 0$, et la concentration à chaque niveau de la sphère est :

$$C = \frac{A r^2}{6 D}$$

A la surface $r = r_0$; la concentration critique d'oxygène nécessaire pour assurer un apport au centre est alors :

$$(2) \quad C_0 = \frac{A r_0^2}{6 D}$$

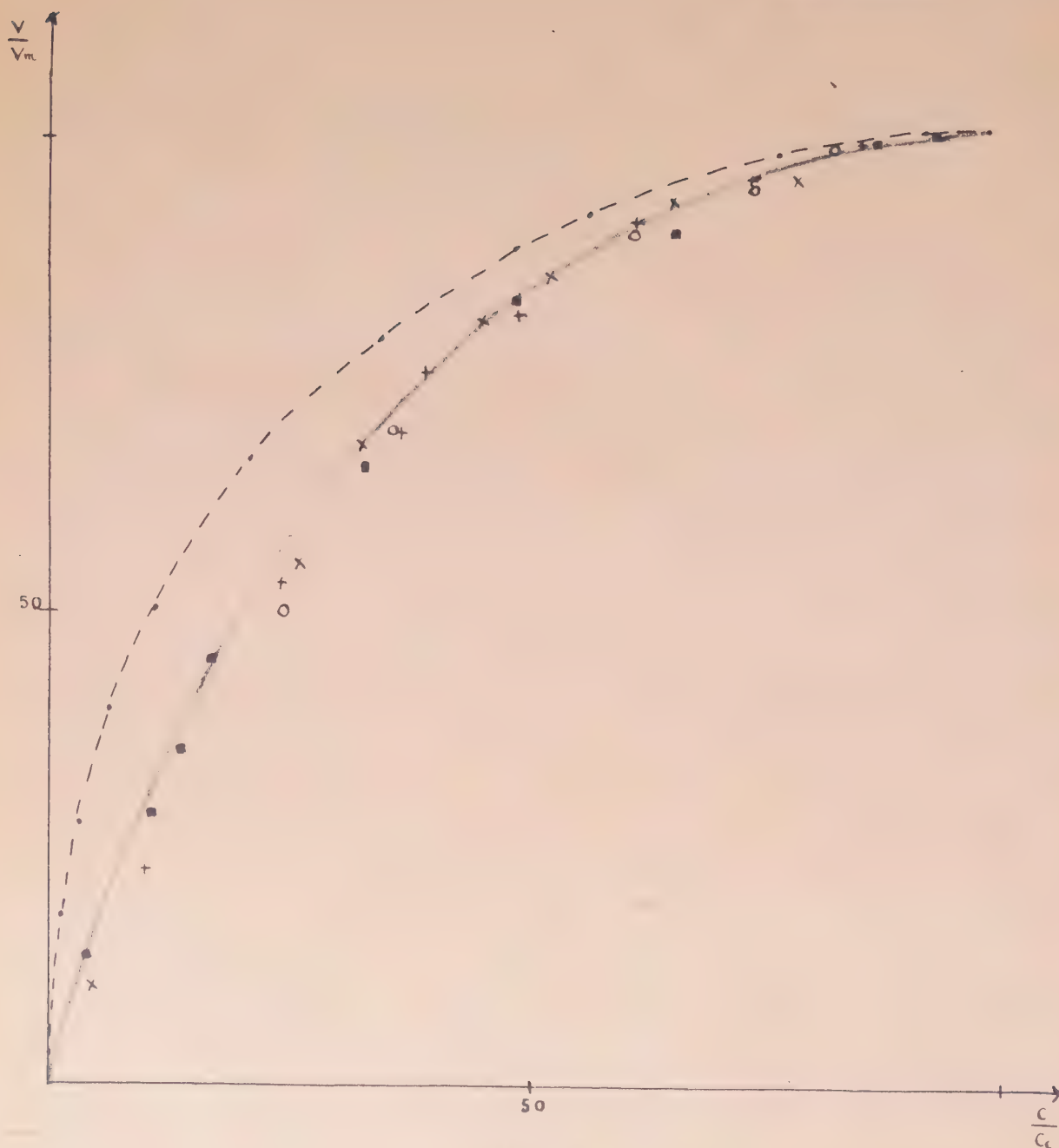
On peut écrire :

$$(3) \quad D = \frac{A r_0^2}{6 C_0}, \quad D \text{ étant le coefficient de diffusion de l'oxygène.}$$

Une telle équation implique que la respiration est constante et indépendante de la tension d'oxygène. En fait il n'en est pas ainsi pour le matériel vivant, et GERARD s'est attaché à établir des relations mathématiques, incluant divers cas possibles:

Correspondance courbes de GERARD-courbes de normalisation

- GERARD $\lambda=A'$ $D=D'$
 — GERARD $\lambda=A'$ $D=Q_{LD}'$
 o D.bisporus
 x D.globosus
 + D.hansenii
 ■ D.hansenii



diffusion et consommation d'oxygène différentes dans deux régions concentriques de la cellule,

respiration fonction de la tension d'oxygène.

Pour les divers cas envisagés, cet auteur donne des valeurs numériques permettant de tracer des courbes représentant les variations du rapport des consommations d'oxygène en fonction du rapport des concentrations.

De telles courbes sont identiques à celles que nous avons appelées "courbes de normalisation". Nous avons donc comparé nos propres graphiques avec ceux tracés à partir des valeurs fournies par GERARD.

La correspondance assez bonne (Pl. X où A et D sont relatifs aux régions corticales de la cellule, A' et D' aux régions profondes) de l'ensemble de nos courbes avec celles de GERARD nous conduit à penser que, dans nos expériences, la vitesse de respiration peut être limitée par la diffusion de l'oxygène à travers les cellules.

De plus la relation donnée par cet auteur permet de calculer les coefficients de diffusion de l'oxygène. Les valeurs trouvées pour nos différentes espèces de levures sont données dans le tableau VI. A titre de comparaison celui-ci contient également les valeurs obtenues par WINZLER pour Saccharomyces cerevisiae, et celles citées par RASHEVSKY pour les chlorelles, dans "Mathematical Biophysics".

Les coefficients de diffusion que nous trouvons sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus par ces auteurs.

Il est à remarquer qu'ils sont environ 18 fois plus faibles que ceux calculés par KROGH (31) pour la diffusion de l'oxygène dans l'eau ou dans le nerf de Grenouille.

En réalité, cette différence ne devrait pas sembler surprenante. En effet, le cytoplasme est un milieu visqueux, hétérogène, contenant de nombreux organites de constitution très différente et un réticulum endoplasmique parfois très développé. Ceci doit correspondre à un allongement, peut-être considérable, du chemin de diffusion pour l'oxygène. Pour atteindre ce cytoplasme, ce gaz doit de plus traverser une paroi de constitution complexe, renfermant certains enzymes, et ensuite une couche nucléoprotéique contenant elle-aussi différentes diastases (Pl. X). On peut dès lors se demander si

D. 1000000	2000	0 glucose	1,75	5	0,1
	2000	0 glucose	1,75	5	0,1
D. 1000000	2000	0 glucose	1,75	12,0	0,1
	2000	0 glucose	1,75	12	0,1
D. 1000000	2000	0 glucose	4,13	10	0,1
	2000	0 glucose	4,13	10	0,1
D. 1000000	2000	0 glucose	1,75	4	0,1
	2000	0 glucose	1,75	4	0,1
D. 1000000	2000	0 glucose	1,75	10	0,1
	2000	0 glucose	1,75	10	0,1
Pic. strasbourg. 2500	2000	0 glucose	1,9	5	6,24
	2000	0 glucose	1,9	5	6,24
Lev. boulangerie 2500	2000	0,1 glucose	15,1	4,7	4
	2000	0,1 glucose	15,1	4,7	4
Calorelles	17000				0,5
RASNEVSKY	2000				0,11
Oxygene					
Tab. Cri. Int.					190

l'oxygène qui pénètre dans la cellule n'est pas freiné immédiatement à la périphérie de la cellule par des "barrières de perméabilité". Pour les fortes tensions d'oxygène, ces barrières sont sans influence. Par contre, pour les faibles concentrations leur rôle n'est plus négligeable, entraînant rapidement une relative anaérobiose des régions internes de la cellule.

Nous savons également que la chaîne des cytochromes se situe à l'intérieur des mitochondries. Pour que l'oxygène arrive à son point d'utilisation, il faut qu'il ait franchi un certain nombre de membranes qui peuvent être plus ou moins facilement traversées, surtout lorsque le milieu est pauvre en oxygène, et qu'ainsi le gradient de concentration est faible.

Les coefficients de diffusion ainsi calculés pourraient donner, peut-être, des indications sur la répartition des mitochondries à l'intérieur de la cellule.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons réalisé des mesures de la respiration de diverses espèces de levures, cultivées dans différentes conditions, par la méthode polarographique, en utilisant une électrode du "type CLARK".

La sensibilité d'une telle méthode est encore accrue par enregistrement des variations de concentration en oxygène en fonction du temps sur un "suiveur de spot" Photodyne, placé à environ 70 cm. du galvanomètre. Dans ces conditions, nous pouvons apprécier une concentration en oxygène de $0,2 \times 10^{-6}$ M/l par mm. de déviation.

Avec ces méthodes nous avons constaté, chez les levures placées dans un milieu dépourvu d'aliment carboné, une respiration endogène qui doit correspondre à une consommation de leurs réserves. Cette respiration endogène décroît avec le temps et cette décroissance semble d'autant plus rapide que la taille des cellules est plus petite.

Lorsque le milieu est enrichi en glucose, la respiration de ces microorganismes est fortement stimulée. L'activité métabolique est encore accrue quand une aération suit l'addition de sucre. Ceci se traduit par une augmentation de la vitesse maximale (V_m) de la concentration correspondant à la moitié de la vitesse maximale (K_m) et également de la concentration critique (C_c).

Selon les conditions de culture - agitation du milieu ou non pendant l'incubation - les levures montrent des variations dans leur respiration. L'anaérobiose relative entraîne une diminution de la vitesse maximale et une augmentation de la concentration critique.

Pour les basses tensions d'oxygène, la respiration se trouve limitée. L'explication d'un tel phénomène peut résider dans l'intervention de réactions enzymatiques classiques. En fait, nos résultats semblent montrer qu'une telle hypothèse ne puisse pas être retenue car nos valeurs expérimentales ne permettent pas d'obtenir des points alignés lorsque nous les traduisons dans les transformations classiques de l'équation de MICHELIS-MENTEN (39).

Cependant, l'existence de réactions enzymatiques plus complexes, comme celles invoquées par WINZLER (58) et d'autres auteurs n'est pas infirmée. Toutefois, la discussion de divers travaux montre que les explications basées sur ces hypothèses sont fragiles.

Une autre explication proposée suppose la diffusion de l'oxygène comme facteur limitant de la respiration des cellules. La correspondance entre les courbes théoriques de GERARD (21) et nos courbes expérimentales d'une part, le calcul des coefficients de diffusion d'autre part, conduisent à penser que c'est vraisemblablement ce phénomène de diffusion qui est le facteur déterminant dans la limitation de la vitesse de respiration aux basses tensions d'oxygène.

Si celà est exact, il en résulte que le coefficient de diffusion de l'oxygène dans les tissus doit être très inférieur à celui dans l'eau. Une explication possible de cette différence réside dans la complexité de la structure cellulaire.

B I B L I O G R A P H I E

- (1) ABADIE (F), PIGNAL (M.C), JACOB (J.L) - 1963 -
Les levures à spores verruqueuses.
Bull. Soc. Mycol. France, 74, 16.
- (2) BARCROFT (J) - 1925 - The respiratory function of the
blood.
Cambridge Univ. Press. London.
- (3) BLINKS (L.R), SKOW (R.V) - 1938 - The time course
of photosynthesis as shown by a rapid
electrode methode for oxygen.
Proc. Nat. Acad. Sci., 24, 420.
- (4) BRIGGS (G.E), HALDANE (J.B.S) - 1925 - A note on the
kinetics of enzyme action.
Biochem. J., 19, 338.
- (5) CARRITT (D.E), KANWISHER (J.W) - 1959 - An electrode
system for measuring dissolved oxygen.
Anal. Chem., 31, 5.
- (6) CHANCE (B) - 1954 - Spectrophotometry of intracellular
respiratory pigments.
Science, 120, 767.
- (7) CHANCE (B), WILLIAMS (G.R) - 1955 - A simple and rapid
assay of oxidative phosphorylation.
Nature, 175, 1120.
- (8) CHANCE (B) - 1957 - Cellular oxygen requierements.
Fed. Proc., 16, 665.
- (9) CHEN (P.S) - 1951 - A comparative study of the oxygen
consumption in three lethal mutants ltr, lgl,
lme, of Drosophila melanogaster.
Z. Vererb., 84, 38.

- (10) CLARK (L.C), WOLF (R), GRANGER (D), TAYLOR (Z) -
1953 - Continuous recording of blood
oxygen tension by polarography.
J. Appl. Physiol., 6, 189.
- (11) CUNNIGHAM (B), KIRK (P.L) - 1941 -
J. Gen. Physiol., 24, 135 (cité par FOURCHE
1937).
- (12) DAVIES (P.W), BRINK (F) - 1942 - Microelectrode for
measuring local oxygen tension in animal
tissues.
Rev. Sci. Inst., 13, 524.
- (13) DAVIES (P.W), BRONK (D.W) - 1957 - Oxygen tension in
mammalian brain.
Fed. Proc., 16, 689.
- (14) DIXON (M) - 1951 - Manometric methods.
Cambridge Univ. Press London.
- (15) DUCET (G), ROSENBERG (A.J) - 1954 - Activité respira-
toire chez les végétaux supérieurs.
Gior. Biochimi, 25, 214.
- (16) DUCET (G), PENELOUX (A) - 1962 - Influence de la dif-
fusion de l'oxygène sur la respiration des
tissus végétaux.
Compt. rend., 225, 1640.
- (17) FENN (W.O) - 1927 - The gaz exchange of nerve during
stimulation.
Amer. J. Physiol., 80, 327.
- (18) FENN (W.O) - 1927 -
J. Gen. Physiol., 10, 767 (cité par GERARD,
1931).
- (19) FOURCHE (g) - 1957 - Etude sur la consommation d'oxy-
gène dans les oeufs de Drosophile durant
leur première heure de développement.
D.E.S. - Lyon (inédit).
- (20) GERARD (R.W) - 1927 -
Amer. J. Physiol., 10, 767 (cité par GERARD,
1931).

- (21) GRARD (R.W) - 1931 - Oxygen diffusion into cells.
Biol. Bull., 60, 245.
- (22) GIEGER-HUBER (M) - 1934 -
Jahrb. wissenschaft. Bot., 81, 1 (cité par
STIER et STANNARD 1936).
- (23) GODDARD (D.R), BONNIER (W.D) - 1960 - Cellular respi-
ration.
Plant Physiol. 1 209.
- (24) HARDEN (A), YOUNG (W.J) - 1902 -
J. Chem. Soc., 81, 1224 (cité par STIER et
STANNARD 1936).
- (25) HEGNER (D), GLOSSMANN (H) - 1965 - Polarographische
Messungen der Atmung bei niedrigen Sauerstoff-
drucken.
Z. Naturforschg., 20, 234.
- (26) HEYROVSKY (J) - 1947 - The fundamental laws of pola-
rography.
Analyst, 72, 229.
- (27) HEYROVSKY (J) - 1958 - Polarography. A historical
survey.
Labo. Practi. G.B., 72, 344.
- (28) HILL (A.V) - 1928 - The diffusion of oxygen and lactic
acid through tissues.
Pro. Roy. Soc. (B), 104, 39.
- (29) KOLTHOFF (I.M), LAITINIEN (H.A) - 1940 - The voltametric
determination of oxygen.
Science, 92, 152.
- (30) KOSINSKI (I) - 1902 -
Jahrb. wissenschaft. Bot., 37, 137.(cité par
STIER et STANNARD 1936).
- (31) KROGH (A) - 1919 -
J. Physiol., 52, 319 (cité par GERARD 1931).
- (32) LEAF (A), RENSHAW (A) - 1957 - Ion transport and
respiration in isolated frog skin.
Biochem. J. 65, 82.

- (33) LEBLOND (C) - 1956 - Mesure de l'intensité respiratoire des organes végétaux à l'aide de l'analyseur de gaz par absorption de rayonnement infra-rouge.
J. Rech. C.N.R.S., 36, 293.
- (34) LEMON (E.R), ERICKSON (A.E) - 1952 - The measurement of oxygen diffusion in the soil with a platinum electrode.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 16, 160.
- (35) LINDENMAYER (A), SMITH (L) - 1964 - Cytochromes and others pigments of baker's yeast grown aerobically and anaerobically.
Biochem. Biophys. Acta, 93, 445.
- (36) LINNANE (A.W), VITOLS (E), NOWLANDS (P.G) - 1962 - Studies on the origin of yeast mitochondria.
J. Cell. Biol., 13, 345.
- (37) LINDERSTRØM-LANG - 1937 - Principles of the cartesian diver applied to gasometric technique.
Nature, 140, 108 (cité par FOURCHE 1937).
- (38) LONGMUIR (I.S), BOURKE (A) - 1960 - The measurement of the diffusion of oxygen through respiring tissue.
Biochem. J., 76, 225.
- (39) MICHAELIS (L), MENTEN (M.L) - 1913 - Die Kinetik der Invertinwirkung
Biochem. Z., 49, 333 (cité par BRIGGS et HALDANE 1925).
- (40) MITSUDA (H), MURAKAWI (K), KAWAI (F) - 1962 - Polarographic determination of respiratory activity with Clark oxygen electrode.
Agr. Biol. Chem., 26, 417.
- (41) Mc CLARY (D.O) - 1964 - The cytology of yeasts.
Bot. Rev., 30, 167.
- (42) MONTGOMERY (H) - 1957 - Oxygen tension of skin and muscle.
Fed. Proc., 16, 697.
- (43) MORGAN (E.H), NAHAS (G.C) - 1950 - Study of relationship of arterial oxygen tension to alveolar oxygen pressure in man, utilising a polarographic methode for whole blood.
Amer. J. Physiol., 163, 736.

- (44) PACKER (L) - 1957 - Coupled phosphorylation in rat heart sarcosomes.
Arch. Biochem. Biophys., 70, 290.
- (45) PACKER (L), MICHAELIS (M), MARTIN (W.R.) - 1958 -
Effect of shock on rat heart and brain mitochondria.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 98, 164.
- (46) PLANTEFOL (L) - 1931 - Cours de Botanique et de Biologie végétale. P.C.B.
- (47) POLAKIS (E.S) , BARTLEY (W), MEEK (G.A), - 1964 -
Changes in the structure and enzyme activity of *Saccharomyces cerevisiae* in response to changes in the environment.
Biochem. J., 90, 369.
- (48) REEVES (R.B), RENNIE (D.W), PAPPENHEIMER (J.R) -
1957 - Oxygen tension in urine and its significance.
Fed. Proc., 16, 693.
- (49) REYES (R.J), NEVILLE (J.R) - 1963 - Cellular oxygen consumption at low oxygen tension.
Aerospace Med. U.S.A., 34, 1103.
- (50) SCHOLANDER (P.F), EDWARDS - 1942 - Volumetric micro-respirometers.
Rev. Sci. Inst., 13, 32.
- (51) SLONIMSKI (P) - 1953 -
Recherches sur la formation des enzymes respiratoires chez la levure.
Thèse Doctorat Paris.
- (52) STEFFANELLI (A) - 1936 -
A new form of microrespirometer with a note on the effect of cleavage on respiration.
J. Exper. Biol., 14, 171.
- (53) STIER (T.J.B), STANNARD (J.N) - 1936 - A kinetic analysis of the endogenous respiration of baker'yeast.
Gener. Physiol., 90, 461.

- (54) STRICKLAND (E.H), ZIEGLER (F.D), ANTONY (A) - 1961 -
Oxygen electrode for measurement of tissue
slice respiration.
Nature, 191, 969.
- (55) TUSTANOFF (E.K), BARTLEY (W) - 1964 - Development of
respiration in yeast grown anaerobically on
different carbon sources.
Biochem. J., 91, 595.
- (56) WARBURG (O) - 1923 -
Biochem. Zeitschr., 142, 317 (cité par
GERARD 1931).
- (57) WARBURG (O) - 1926 - Uber den Stoffweschel der
Tumoren.
Berlin : Springer (cité par DIXON 1951).
- (58) WINZLER (R.J) - 1941 - The respiration of baker'yeast
at low oxygen tension.
J. Cell. Comp. Physiol., 17, 263.
- (59) YOUNG (R.E), BIALE (L.B) - 1962 - Carbon dioxide
effects on fruit respiration. I : Measure-
ment of oxygen uptake in continuous gaz
flow.
Plant Physiol., 37, 409.

Vu :

Les Membres du Jury,

MM. KUHNER
DUCET
BOIDIN

Vu et approuvé

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :

LYON, le 30 Août 1965

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

P. LOUIS

